

Analiza crijevne mikrobiote skupine ljudi s područja grada Zagreba te usporedba s crijevnim mikrobiotama okarakteriziranih svjetskih populacija

Salopek, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:373316>

Rights / Prava: [Attribution-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Marta Salopek

**ANALIZA CRIJEVNE MIKROBIOTE
SKUPINE LJUDI S PODRUČJA
GRADA ZAGREBA TE USPOREDBA
S CRIJEVNIM MIKROBIOTAMA
OKARAKTERIZIRANIH SVJETSKIH
POPULACIJA**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Antonia Starčevića u Laboratoriju za bioinformatiku na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Institutu za antropologiju u Zagrebu.

Ovaj je rad izrađen u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06-3509 „Istraživanje ravnoteže mikrobioma debelog crijeva – MicroEquilibrium“, voditelj prof. dr. sc. Antonio Starčević.



Mentoru, obitelji i prijateljicama – uz vas je sve jednostavnije i zabavnije; hvala vam.

Thank you to the Room6030 team, without whom this journey wouldn't be the same.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Kabinet za bioinformatiku

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

ANALIZA CRIJEVNE MIKROBIOTE SKUPINE LJUDI S PODRUČJA GRADA ZAGREBA TE USPOREDBA S CRIJEVNIM MIKROBIOTAMA OKARAKTERIZIRANIH SVJETSKIH POPULACIJA

Marta Salopek, univ. bacc. nutr. 0058210887

Sažetak: Crijevna mikrobiota složena je zajednica mikroorganizama koja ima važnu ulogu u probavi, sintezi vitamina, obrani od patogena i održavanju epitelne barijere. Čimbenici koji utječu na njen sastav, a time i na funkcije, mnogobrojni su. Napredci u metodama sekvenciranja i analizama podataka omogućuju njihovo dublje razumijevanje, kao i usporedbu sastava mikrobiote među različitim populacijama. Ova su istraživanja od neizmjerne važnosti jer pružaju temelje za očuvanje zdravlja i prilagođene medicinske intervencije. U ovom je radu provedena usporedba sastava mikrobiote populacije u gradu Zagrebu s drugim populacijskim skupinama upotrebom 16S rRNA sekvenciranja uz Illumina MiSeq te bioinformatičku platformu QIIME 2. U skladu s literaturom, utvrđeno je da su dva najzastupljenija koljena Firmicutes i Bacteroidetes, dok je najzastupljeniji rod *Bacteroides*. Sastav crijevne mikrobiote promatrane populacije podudara se sa sastavom drugih populacija koje također žive u urbanim područjima. Opsežnija su istraživanja svakako nužna, kao i usklađivanje metodoloških pristupa na globalnoj razini.

Ključne riječi: *crijevna mikrobiota, 16S rRNA sekvenciranje, QIIME 2, mikrobiom*

Rad sadrži: 50 stranica, 13 slika, 2 tablice, 92 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Antonio Starčević

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednica)
2. prof. dr. sc. Antonio Starčević (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko (član)*
4. prof. dr. sc. Igor Slivac (zamjenski član)

Datum obrane: 27. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Section for Bioinformatics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

ANALYSIS OF THE GUT MICROBIOTA OF A GROUP OF PEOPLE FROM THE CITY OF ZAGREB AND COMPARISON WITH THE GUT MICROBIOTA OF CHARACTERIZED WORLD POPULATIONS

Marta Salopek, univ. bacc. nutr. 0058210887

Abstract: Gut microbiota is a complex community of microorganisms crucial for digestion, vitamin synthesis, defense against pathogens and maintaining the epithelial barrier. Various factors influence its composition and functions. Advances in sequencing techniques and data analysis have enabled a profound understanding and cross-population comparisons of microbiota composition. These studies are crucial for preserving health and tailoring medical interventions. In this research, a comparison of the microbiota composition of the population in the city of Zagreb with other population groups was carried out using 16S rRNA sequencing with Illumina MiSeq and the bioinformatics platform QIIME 2. As expected, Firmicutes and Bacteroidetes are dominant, with *Bacteroides* as the most abundant genus. The intestinal microbiota composition of this population aligns with other urban populations. Further comprehensive research is undoubtedly essential, along with the global coordination of methodological approaches.

Keywords: *gut microbiota, 16S rRNA sequencing, QIIME 2, microbiome*

Thesis contains: 50 pages, 13 figures, 2 tables, 92 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Antonio Starčević PhD, Full professor

Reviewers:

1. Blaženka, Kos, PhD, Full professor (president)
2. Antonio Starčević, PhD, Full professor (mentor)
3. Jurica, Žučko, PhD, Associate professor (member)
4. Igor, Slivac, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 27th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA	2
2.2. ULOGE I FUNKCIJE CRIJEVNE MIKROBIOTE	3
2.2.1. Metabolička funkcija	3
2.2.2. Antimikrobna uloga	4
2.2.3. Utjecaj mikrobiote na epigenetičke modifikacije	5
2.3. RAZVOJ CRIJEVNE MIKROBIOTE	5
2.4. BOLESTI POVEZANE S DISBIOZOM MIKROBIOTE	6
2.4.1. Infektivne bolesti	7
2.4.2. Tumori	7
2.4.3. Metabolički poremećaji i upalne bolesti crijeva	8
2.5. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE	9
2.5.1. Prehrana	9
2.5.2. Antibiotici	11
2.6. METODE SEKVENCIRANJA S CILJEM ODREĐIVANJA SASTAVA MIKROBIOTE	12
2.6.1. Sekvenciranje amplikona	12
2.6.2. <i>Shotgun</i> metagenomsko i RNA sekvenciranje	14
2.6.3. Usporedba metoda sekvenciranja	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Pribor	16
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Uređaji	17
3.2. METODE	17
3.2.1. Prikupljanje uzoraka	17
3.2.2. DNA ekstrakcija i određivanje koncentracije DNA	17
3.2.3. Izrada DNA knjižnice i sekvenciranje	19
3.2.4. Analiza podataka uz QIIME 2	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. PROVJERA KVALITETE ULAZNIH SEKVENCI	24
4.2. ALFA I BETA RAZNOLIKOST	25
4.3. TAKSONOMSKA ZASTUPLJENOST BAKTERIJA	28

4.4. TEMELJNI ČLANOVI CRIJEVNE MIKROBIOTE	34
4.4.1. Izazovi u metodologiji tijekom istraživanja crijevne mikrobiote	36
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA.....	39

1. UVOD

Crijevna mikrobiota predstavlja složenu mikrobnu zajednicu koja nastanjuje gastrointestinalni trakt ljudi. Ovi mikroorganizmi među ostalim sudjeluju u probavi hrane, sintezi vitamina i žučnih kiselina, prevenciji djelovanja patogenih bakterija te pridonose funkciji epitelne barijere. Životni stil ima velik utjecaj na sastav pa time i na funkcije crijevne mikrobiote. Naprimjer, prehrana koju karakterizira većinom procesirana hrana drugačije će djelovati na crijevnu mikrobiotu nego prehrana koja obiluje probioticima i prebioticima. Ovo i mnoga druga saznanja povezana s crijevnom mikrobiotom omogućena su razvojem novih tehnologija koje su dale uvid u složena djelovanja mikrobnih zajednica. To prvenstveno uključuje napredak u metodama sekvenciranja i metodama obrade podataka koji proizlaze iz istih. Potonji tako mogu dati odgovore na mnoga pitanja – koje mikrobne vrste su prisutne, koja je njihova uloga te kako dolazi do promjene u njihovu sastavu uslijed bolesti ili kao posljedica promjena obrazaca prehrane i životnog stila domaćina.

Nadalje, usporedba sastava mikrobiote među različitim populacijskim skupinama danas je također predmet mnogih istraživanja. Već spomenuti životni stil i prehrana mogu biti samo neki od faktora koji utječu na sastav mikrobiote određene populacije. Uz njih, valja spomenuti i kulturne običaje, evolucijske prilagodbe i druge genetičke čimbenike te specifične bolesti ili zdravstvena stanja vezana za određeno područje. Ovakva su istraživanja važna jer među ostalim pružaju temelje za prilagođene medicinske intervencije. Da bi se to omogućilo, nužno je odrediti koji su članovi crijevne mikrobiote prisutni kod svih zdravih pojedinaca, a neovisno o geografskim i inim distinktivnim čimbenicima.

Cilj je ovog rada bio usporediti sastav mikrobiote populacije koja živi u gradu Zagrebu sa sastavom mikrobiota drugih populacijskih skupina. U tu je svrhu provedeno 16S rRNA sekvenciranje uz Illumina MiSeq uređaj, a obrada dobivenih podataka izvršena je uz bioinformatičku platformu QIIME 2.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA

Mikrobiota je dinamična zajednica mikroorganizama (bakterija, *archaea*, gljivica i virusa) koji se nalaze u i na ljudskom tijelu (Turnbaugh i sur., 2007) – gastrointestinalnom traktu, koži, respiratornom, vaginalnom i urinarnom traktu te mliječnim žlijezdama (Tablica 1) – a koji mogu biti komensalni, simbiotski ili patogeni (Rojo i sur., 2017). Njihov broj veći je od ukupnog broja stanica čovjeka (Sender i sur., 2016; Turnbaugh i sur., 2007), a najveći broj (~70%) nalazi se u gastrointestinalnom traktu, s rastućom gustoćom od proksimalnog prema distalnom dijelu. Ova je zajednica mikroorganizama poznata pod zajedničkim nazivom *crijevna mikrobiota čovjeka*.

2007. godine započeo je tzv. *The Human Microbiome Project* (HMP) – temeljno istraživanje s ciljem dubljeg razumijevanja složenog mikrobiološkog ekosustava prisutnog u i na ljudskom tijelu. S fokusom na crijevnu mikrobiotu, ovim je projektom identificirano i sekvencirana je DNA mnogobrojnih mikroorganizama koji se nalaze u gastrointestinalnom traktu ljudi. Kroz suradnju znanstvenika ovim je projektom dan uvid o važnoj ulozi mikrobiote u održavanju zdravlja i povezanošću s bolestima. Ishodi su ovog projekta tako dali nova saznanja o međuovisnosti mikroorganizama i ljudi te potaknuli daljnja istraživanja u područjima kao što je medicina (Turnbaugh i sur., 2007).

Tablica 1. Približne vrijednosti površine i bioraznolikosti mikroorganizama na dijelovima tijela odraslih ljudi (*prema* Rojo i sur., 2017)

dio tijela	približna površina	približan broj rodova
gastrointestinalni trakt	300-400 m ²	1183-3180
oralna šupljina	215 cm ²	600
respiratorni trakt	160 m ²	314
koža	1,8 m ²	113
urinarni trakt	350 cm ²	20-500
vaginalni trakt	90 cm ²	282

Nakon što je donedavno bila gotovo u potpunosti izostavljena, crijevna mikrobiota čovjeka danas je predmet mnogih istraživanja. Razlog su tome brojni pokazatelji povezanosti mikrobiote sa zdravljem i bolešću, a koji su omogućeni prvenstveno kao rezultat napretka tehnika sekvenciranja i bioinformatičkih alata (Hiraoka i sur., 2016). Napredci i dosezi u ovim područjima danas su uistinu iznimni i vrlo značajni, što pokazuje i nedavno uspješno sekvenciranje ljudskog Y kromosoma (Rhie i sur., 2023; Hallast i sur., 2023).

2.2. ULOGE I FUNKCIJE CRIJEVNE MIKROBIOTE

2.2.1. Metabolička funkcija

Crijevnu mikrobiotu karakteriziraju vrlo važne biološke i fiziološke uloge, prvenstveno metabolička i imunosna. Rodovi *Bacteroides*, *Roseburia* i *Bifidobacterium* najznačajniji su predstavnici koji sudjeluju u probavi ugljikohidrata (Jandhyala i sur., 2015). Kratkolančane masne kiseline (u najvećoj mjeri acetat, butirat i propionat) glavni su produkti bakterijske fermentacije, a obilježavaju ih vrlo važne biološke funkcije. One su među ostalim izvor energije za crijevnu mikrobiotu i intestinalne epitelne stanice domaćina (Reva i sur., 2023). Osobito je zanimljiva složena uloga butirata, koji (1) može služiti kao izvor energije reakcijom β -oksidacije u mitohondriju kada nastaju $FADH_2$ i $NADH$ koji kasnije sudjeluju u prijenosu elektrona, a nastalim gradijentom protona u konačnici nastaje ATP (Teparić, 2018) ili kao (2) tumor-supresivni metabolit, inducirajući apoptozu nakupljanjem u jezgrama tumorskih stanica (Bultman, 2017). Još neke od njegovih uloga bit će spomenute kasnije u ovom radu.

U metabolizmu ugljikohidrata prevladaju članovi već spomenutog roda *Bacteroides*, uz aktivnost enzima kao što su polisaharid liaza, glikozid hidrolaza i glikozil transferaza. Zanimljiv je slučaj *Bacteroides thetaiotaomicron* vrste čiji genom kodira za više od 260 hidrolaza, što je značajno više u usporedbi s humanim genomom (Cantarel i sur., 2012). Isti mikroorganizam također sudjeluje u poboljšanju efikasnosti hidrolize lipida regulirajući ekspresiju kolipaze potrebne za probavu lipida (Hooper i sur., 2001). Osim toga, mikrobne peptidaze i proteinaze zajedno s humanim proteazama sudjeluju u razgradnji proteina. Ovdje valja spomenuti bakteriocine, antimikrobne peptide koji nastaju mikrobnom konverzijom amino kiselina transportiranih iz intestinalnog lumena u bakterijske stanice, o kojima će više riječi biti kasnije. Nadalje, mikrobnom konverzijom mogu nastati i histamin (iz L-histidina uz histamin dekarboksilazu) i GABA (gama-aminomaslačna kiselina; iz glutamata glutamat

dekarboksilazom), molekule specifičnih fizioloških i neuroloških uloga (Jandhyala i sur., 2015). Istraživanja su također pokazala da je crijevna mikrobiota čovjeka uključena u razgradnju različitih polifenola. Polifenolni sekundarni metaboliti prisutni su u raznim biljkama, voću i proizvodima biljnog podrijetla (vino, kakao, čaj). Konkretnije, flavonoidi i njegove podskupine apsorbiraju se u crijevu. Oni su glikozilirani derivati te su kao takvi neaktivni, međutim, djelovanjem crijevne mikrobiote biotransformiraju se u aktivne spojeve uklanjanjem šećerne komponente. Strukturna specifičnost polifenola i raznovrsnost mikrobiote pojedinca određuju razinu biotransformacije koja se odvija u crijevima. Konačni aktivni produkti apsorbiraju se putem portalne vene do drugih organa i tkiva, pružajući antimikrobno i druga metabolička djelovanja (Jandhyala i sur., 2015).

Sinteza vitamina K i nekoliko vitamina iz B skupine također je jedna od važnijih metaboličkih uloga crijevne mikrobiote. Zanimljiv je i utjecaj mikrobiote na povećanje koncentracije piruvične, citratne i fumarne kiseline u serumu, što je pokazatelj povoljnijeg stanja energetskog metabolizma (Velagapudi i sur., 2010).

2.2.2. Antimikrobna uloga

Osim metaboličke uloge, važno je spomenuti i antimikrobno djelovanje crijevne mikrobiote. Ranije spomenuti bakteriocini djeluju na način da inhibiraju rast patogenih bakterija remećenjem esencijalnih staničnih procesa – sintezu i integritet stanične stijenke te važne metaboličke puteve – rezultirajući tako smrću stanica i suzbijanjem njihove proliferacije unutar ekosustava crijevne mikrobiote. Nadalje, značajna je sposobnost *Lactobacillus* sp. da proizvodi mliječnu kiselinu koja može pridonijeti antimikrobnoj aktivnosti enzima lizozima narušavajući strukturu vanjske membrane stanične stijenke bakterija. Još jedan primjer djelovanja crijevne mikrobiote protiv patogena je lokalno induciranje imunoglobulina. Crijevna mikrobiota, osobito Gram-negativni mikroorganizmi poput roda *Bacteroides*, pokazali su sposobnost aktivacije crijevnih dendritičkih stanica inducirajući na taj način plazma stanice u intestinalnoj mukozi na proizvodnju sekretijskog imunoglobulina A (sIgA) (He i sur., 2007). Uloga sekretijskog IgA očituje se u lokalnoj imunosnoj obrani na mukoznim površinama, uključujući crijeva, tako što se veže na patogene i neutralizira ih sprječavajući tako njihovo vezanje na mukoza. Time ima vrlo važnu ulogu u održavanju zdravlja crijeva i suzbijanju infekcija. Nadalje, neki od metabolita povećavaju funkciju mukozne barijere i imunosnu toleranciju tako što inhibiraju signalni put nuklearnog faktora kappa b, aktiviraju proizvodnju interleukina-18 te smanjuju aktivaciju T

stanica. Osim toga, posredno utječu na smanjenje koncentracije kolesterola u plazmi, normaliziranje razine glukoze u krvi smanjenje akumulacije masti u bijelom adipoznom tkivu te pospešuju oksidaciju masnih kiselina (Kolodziejczyk i sur., 2019).

2.2.3. Utjecaj mikrobiote na epigenetičke modifikacije

Osim navedenih funkcija, zanimljiva je uloga metabolita crijevne mikrobiote kao pokretača epigenetičkih modifikacija – nasljednih promjena u ekspresiji gena koje nisu određene samom DNA već dinamičnim kemijskim modifikacijama kao što su metilacija DNA te metilacija i acetilacija histona. Epigenetičke su modifikacije pod utjecajem metabolizma koji osigurava supstrate enzimima uključenim u modifikaciju kromatina – kako onog domaćina tako i mikrobnog – i okolišnih faktora poput tjelesne aktivnosti, pušenja, izlaganja toksinima te prehrane. Npr., kratkolančane masne kiseline inhibiraju histon deacetilaze regulirajući tako nekoliko fizioloških funkcija, od kojih valja istaknuti održavanje imunosne homeostaze u kolonu (Reva i sur., 2023).

2.3. RAZVOJ CRIJEVNE MIKROBIOTE

Period dojenja i djetinjstvo najvažnija su razdoblja za oblikovanje i razvoj crijevne mikrobiote. Tijekom prve tri godine života, prevalentna mikrobiota dojenčadi i djece pokazuje određenu razinu sličnosti, brzo se mijenja, a potom postiže stabilnu zajednicu mikrobiote koja je slična onima u odraslih ljudi (Lv i sur., 2022). Prije toga, razvoj crijevne mikrobiote prolazi kroz tri stadija: faza razvoja (3-14 mjeseci), faza prijelaza (15-30 mjeseci) i faza stabilnosti (31 mjesec nadalje). U prvoj fazi dominira rod *Bifidobacterium*, drugu fazu obilježava značajna promjena kod dvije vrste Proteobacteria i Bacteroidetes, dok u posljednjoj fazi dominira Firmicutes. Osim toga, kod zdrave djece prevladavaju *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* i Lachnospiraceae, dok je kod odraslih to *Bacteroides* (Hollister i sur., 2015). Nadalje, pokazalo se da razvoj mikrobiote kod dojenčadi i djece utječe na regulaciju imunskih odgovora i potencijalnih bolesti tijekom kasnijeg života (Goulet, 2015). Na navedeno utječu mnogi čimbenici: postnatalne medicinske intervencije, način prehrane, dojenje, majčino prenatalno stanje te način poroda. Potonji se smatra vrlo važnim čimbenikom za razvoj povoljne mikrobiote kod novorođenčadi. Unatoč sličnosti u razvoju tijekom prvih 6 mjeseci, mikrobiota kod carskim rezom rođene djece usporava svoj razvoj tijekom idućih 6 mjeseci, a potom se nastavlja tijekom

sljedeće godine. Osim toga, pokazalo se da kod djece rođene carskim rezom dolazi do češće pojave dijabetesa tipa 1, celijakije, astme i pretilosti (Lv i sur., 2022). Način hranjenja sljedeći je čimbenik koji će uvelike definirati sastav mikrobiote kod novorođenčadi. Poznato je povoljno djelovanje dojenja u razvoju mikrobiote kod dojenčadi – neposredno pružanjem probiotika te posredno potičući rast korisnih vrsta oligosaharidima kao prebioticima. Konkretnije, majčino mlijeko sadrži neprobavljive glikane poznate pod nazivom oligosaharidi majčinog mlijeka (engl. *human milk oligosaccharides* (HMO)). Oni su izvor nutrijenata za mikrobiotu novorođenčadi te podržavaju selektivan rast povoljnih *Bifidobacterium* sp. Mikrobiota djece koja nisu dojena stoga se neupitno razlikuje od mikrobiote djece koja jesu (Jandhyala i sur., 2015). Tako se kod potonjih u većoj mjeri osim *Bifidobacterium*, nalaze i povoljne *Lactobacillus* i *Clostridium* vrste, a kod one djece koja nisu dojena raznolikost i rast mikrobiote znatno su smanjeni (Lv i sur., 2022), a prevladavaju *Streptococcus*, *Clostridia*, *Bacteroides* i *Enterococcus* (Groer i sur., 2014). Dodatno, razgradnjom oligosaharida pruženih majčinim mlijekom nastaju povoljni metaboliti poput butirata. Osim toga, dolazi do modulacije imunskog sustava poticanjem ekspresije imunoglobulina G (IgG) (Ouweland i sur., 2002).

Uz to, okolišni faktori također su važan čimbenik koji utječe na sastav mikrobiote kako kod odraslih, tako i kod djece. Ovdje valja spomenuti antibiotike kao najčešće uzročnike disbalansa u sastavu crijevne mikrobiote, a time i potencijalnih poremećaja u kasnijoj dobi, kao što su dijabetes tip 1, astma, sklonost alergijama i pretilost. Ova su saznanja vrlo važna u kontekstu otkrivanja i prevencije bolesti kod djece sklone istima (Lv i sur., 2022).

2.4. BOLESTI POVEZANE S DISBIOZOM MIKROBIOTE

Crijevna je mikrobiota vrlo važna zbog svoje posredničke uloge između okoliša i domaćina. Pojava disfunkcionalne mikrobiote naziva se disbioza, a očituje se u promjeni kako strukture bakterijskih zajednica, tako i u njihovoj metaboličkoj aktivnosti. Istraživanje iz 2017. pokazalo je da je više od 100 bolesti i poremećaja povezano s disbiozom mikrobiote, među kojima se ističu autoimune, metaboličke i kardiovaskularne bolesti, dijabetes, pretilost, neuropsihijatrijski poremećaji te tumori (Rojo i sur., 2017). Ostaje dvojbeno u kojoj su mjeri ove promjene uzrok ili posljedica bolesti.

2.4.1. Infektivne bolesti

Povoljna crijevna mikrobiota natječe se za hranjive tvari s patogenim bakterijama, a osim toga djeluje i antagonistički protiv istih. Ranije spomenuti bakteriocini ovdje imaju važnu ulogu, a primjer je laktobacilin kojeg proizvode *Lactobacillus* vrste prevenirajući tako infekciju uzrokovanu bakterijom *Listeria monocytogenes* (Rolhion i sur., 2019). Infektivne bolesti i njihovo liječenje uvelike utječu na crijevnu mikrobiotu. 2007. godine Turnbaugh i suradnici kao jedan od ishoda HMP-a predvidjeli su „lijek 21. stoljeća koji sadrži članove mikrobiote ljudi“. To je upravo i ostvareno krajem travnja ove godine kada je američka FDA (engl. *Food and Drug Administration*) odobrila prvi oralni lijek temeljen na konceptu transplantacije fekalne mikrobiote. Navedeni lijek sadrži žive bakterije izolirane iz ljudske fekalne tvari, a čiji je cilj liječenje infekcije uzrokovane bakterijom *Clostridioides difficile* (FDA, 2023). *C. difficile* anaeroban je, Gram-pozitivan, sporogen bacil. Terapija antibioticima utječe na homeostazu u crijevima – među ostalim smanjujući broj povoljnih anaerobnih bakterija koje proizvode butirat te posredno smanjujući mogućnost otpornosti prema *C. difficile* koja proizvodi toksine (Gu i sur., 2016). Prekomjerno razmnožavanje *C. difficile* s patogenim učinkom jedna je od učestalijih komplikacija izazvanih terapijom antibioticima, a povezana je s dijarejom, povišenom temperaturom, bolovima u abdomenu te u nekim slučajevima otkazivanjem organa i smrću. Točnije, 15 000 - 30 000 smrtnih slučajeva godišnje u SAD-u povezuje se upravo s ovom bolešću (FDA, 2023).

2.4.2. Tumori

Kronična upala uzrokovana infekcijom *Helicobacter pylori* povezana je s rakom želuca. *H. pylori* uzrokuje gubitak stanica koje proizvode kiselinu (parijetalni sloj stanica) što posljedično dovodi do želučane atrofije, metaplazije, displazije te u konačnici razvoja karcinoma. Prevencija je dakako moguća ukoliko se infekcija liječi prije razvoja kroničnog atrofičnog gastritisa (Wong i sur., 2004). Mikrobna disbioza također je povezana s rakom debelog crijeva. Kod ove je bolesti uočen porast potencijalnih patogena kao što su *Pseudomonas*, *Helicobacter* i *Acinetobacter*, dok je očekivano smanjena gustoća povoljnih bakterija koje proizvode butirat (Castellarin i sur., 2012). Nadalje, uočeno je da enterotoksigeni *Bacteroides fragilis* proizvodi toksin fragilizin, posredno uzrokujući proliferaciju stanica i proizvodnju upalnih medijatornih molekula (Shiryaev i sur., 2013). Osim toga, bakterije *Enterococcus faecalis* i *E. coli* potiču oštećenje DNA putem genotoksičnih mehanizama (Cuevas-Ramos i sur., 2010). Nedavno istraživanje uz

8 različitih i geografski neovisno provedenih *shotgun* metagenomskih analiza dalo je iscrpne podatke koji pružaju uvid u obrasce sastava mikrobiote kod bolesnika s rakom debelog crijeva. Identificirano je ukupno 29 ključnih vrsta, a funkcionalna analiza pokazala je povećanu prisutnost gena koji sudjeluju u katabolizmu proteina i mucina te podzastupljenost onih gena koji sudjeluju u razgradnji ugljikohidrata. Osim toga, prisutnost povećane proizvodnje sekundarnih žučnih kiselina iz metagenomskih podataka povezuje ovu bolest s prehranom bogatom mastima i visokim unosom mesa (Wirbel i sur., 2019).

2.4.3. Metabolički poremećaji i upalne bolesti crijeva

Crijevna mikrobiota također je usko povezana s metaboličkim poremećajima kao što su pretilost, dijabetes tip 2 i kardiovaskularne bolesti. Trenutno nema jasnog odgovora što je uzrok, a što posljedica, no jasno je da su prehrana, mikrobiota i životni stil usko povezani s navedenim bolestima (Durack i Lynch, 2018). Kod pretilih osoba tako je uočen smanjen broj *Bacteroides* spp. (Andoh i sur., 2016) u odnosu na zdrave pojedince. Uz to, dokazano je da je transplantacija fekalne mikrobiote iz zdravih donora u pretilu pacijente kod istih pridonijela poboljšanju inzulinske rezistencije (Vrieze i sur., 2012).

Među bolestima povezanim s crijevnom mikrobiotom valja spomenuti i upalne bolesti crijeva. Ovdje spadaju Crohnova bolest i ulcerozni kolitis. Njihov je razvoj pod utjecajem genetike, imunskih faktora te crijevne mikrobiote. Do promjene u sastavu mikrobiote dolazi vrlo rano u razvoju ovih bolesti. Tako je pokazano da dolazi do porasta u broju i rastu patogene *Bacteroides fragilis* te do smanjenja broja povoljnih bakterija poput *Eubacterium rectale* i *Roseburia intestinalis* (Vich Vila i sur., 2018). Nadalje, razvoj ove bolesti povezan je i s narušavanje intestinalne barijere – koja predstavlja ne samo mikrobnu već i imunsku, kemijsku i mehaničku barijeru. Ovo se među ostalim očituje preko promjene u strukturi i sastavu glikana na površinama intestinalnih epitelnih stanica (Kudelka i sur., 2020). Kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva također dolazi i do disbalansa metaboloma u crijevu, karakteriziranim neuravnoteženim razinama prvenstveno kratkolančanih masnih kiselina, žučnih kiselina i triptofana (Qiu i sur., 2022). Konkretnije, proizvodnja sfingolipida i žučnih kiselina je pojačana, dok je smanjena proizvodnja tetra-pirola i triacilglicerola. Kratkolančane masne kiseline reguliraju mukozalnu imunost sudjelujući u razvoju B stanica i diferencijaciji regulatornih T stanica (Treg). Osim toga, mogu aktivirati i proizvodnju upalnih citokina. Butirat također može djelovati na imunosne stanice u intestinalnoj mukozi te može povećati količinu i aktivnost Treg

stanica, kao i inhibirati aktivnost neutrofila, makrofaga i dendritičkih stanica. Kod pacijenata s upalnim bolestima crijeva, porast broja upalnih stanica povezuje se upravo sa smanjenim brojem kratkolančanih masnih kiselina (Goncalves i sur., 2018). Povezanost mikrobiote i navedenih bolesti nedvojbeno je vrlo složena. Trenutni oblici terapije uključuju suplementaciju probioticima, poglavito bakterijama koje proizvode butirac; te transplantaciju fekalne mikrobiote.

2.5. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE

Na sastav crijevne mikrobiote utječu mnogi čimbenici, kao što su genetika, starosna dob, bolesti, uzimanje antibiotika, dojenje, tjelesna aktivnost te u najvećoj mjeri – prehrana. Nadalje, ovi čimbenici razlikuju se kako među pojedincima tako i među populacijskim skupinama. Npr. ljudi koji žive u Nizozemskoj piju više mlijeka te, zanimljivo, uzimaju manje antibiotika od ostatka Europe (Zhernakova i sur., 2016). Osim toga, Yatsunenکو i sur. (2012) primijetili su da su kod pripadnika istih i relativno malih okolina (npr. članovi iste obitelji) prisutni slični obrasci u sastavu mikrobiote.

2.5.1. Prehrana

Ranije u ovom radu spomenuta je važnost dojenja kod novorođenčadi, međutim prehrana nastavlja biti vrlo važan čimbenik koji utječe na crijevnu mikrobiotu – kako na njen sastav tako i raznolikost – i u odrasloj dobi. Posljednjih se godina mnoga istraživanja bave utjecajem prehrane na crijevnu mikrobiotu. Prehrana je definirana kulturnim, socio-ekonomskim te geografskim uvjetima, a od svih čimbenika koji utječu na mikrobiotu, pojedinac ima najviše utjecaja upravo na taj.

Neka od istraživanja pokazala su da je mikrobiota ljudi zapadnog svijeta manje raznolika u odnosu na populacije čiju prehranu karakterizira većinom sirova i neprocesirana hrana. Nadalje, „zapadna“ prehrana – koju karakterizira nizak unos povrća i voća, vlakana i mono- i polinezasićenih masti; te obilje zasićenih i trans masti, proteina životinjskog podrijetla, soli i šećera – pruža predispozicije za kardiovaskularne bolesti i metaboličke poremećaje kao što su pretilost, dijabetes tipa 2, tumori te nealkoholna masna jetra. Pokazalo se da ovaj obrazac prehrane podržava rast rodova *Bilophila*, *Alistipes* i *Bacteroides* (David i sur., 2014), koji proizvode metabolite negativnog učinka na zdravlje (indol i trimetilamin N-oksidi) te smanjuju dostupnost onih pozitivnog učinka (sulforafan i kratkolančane masne kiseline). S druge strane,

mediteransku prehranu karakterizira nizak unos šećera, crvenog mesa, zasićenih masti i mliječnih proizvoda, umjeren unos crnog vina, ribe i peradi te visok unos povrća, voća, vlakana, polifenola, proteina biljnog podrijetla te mono- i polinezasićenih masnih kiselina. Kod populacije koja uživa ovaj tip prehrane uočen je porast rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Prevotella* i *Eubacteria*, a koji proizvode metabolite povoljne za zdravlje domaćina (kratkolančane masne kiseline, sulforafan, polisaharid A). Osim toga, namirnice koje obilježavaju mediteranski tip prehrane sadrže prebiotike – neprobavljive sastojke hrane koji potiču razvoj i aktivnost po zdravlje povoljnih bakterija – polidekstrozu, fruktane, frukto- i galaktooligosaharide, itd. (Zmora i sur., 2019). Valja nadodati kako populaciju koja uživa mediteranski tip prehrane obilježava niža stopa pojave tumora, kardiovaskularnih bolesti te smrtnosti.

Utjecaj obrazaca prehrane uočen je i u različitosti sastava mikrobiote kod djece. Tako je zapaženo da je kod djece iz područja ruralne Afrike povećan broj *Prevotella* vrsta, a kod djece koja žive u Europi *Bacteroides* (De Filippo i sur., 2010). Iako su *Bacteroides* i *Prevotella* funkcionalno i taksonomski slične, povećan broj *Prevotella* vrsta ukazuje na većinski biljnu prehranu prisutnu kod djece iz ruralne Afrike, dok je kod djece u Europi većinski zastupljena prehrana karakterizirana životinjskim proteinima, šećerom te niskom razinom vlakana; što se i očituje u povećanom broju *Bacteroides* vrsta (Jandhyala i sur., 2015).

Probava celuloze, rezistentnog škroba i fruktooligosaharida (FOS) omogućena je hidrolizom enzima sintetiziranih pomoću bakterija iz roda *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Ruminococcus*. Konkretnije, kao posljedica razgradnje namirnica poput češnjaka i krucifernog povrća, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrste sintetiziraju značajne količine folata (Ng i sur., 2018) i sulforafana, a koji imaju antitumorsko djelovanje tako što smanjuju aktivnost DNA metiltransferaza u stanicama raka prostate (Su i sur., 2018). U posljednje se vrijeme sve više istražuje uloga bakterije *Akkermansia muciniphila*, koja po brojnim istraživanjima ima vrlo značajan probiotički učinak. Među ostalim, ima važnu ulogu u održavanju integriteta mukozalne barijere crijeva te je povezana s protuupalnim, antioksidativnim i imunomodulatornim djelovanjem. Pokazalo se da prehrana bogata fruktooligosaharidima podržava rast ove bakterije, dok prehrana bogata mastima i velike količine alkohola djeluju suprotno (Zhou, 2017).

Zanimljivo, u mikrobiomu populacije ljudi koja živi u Japanu uočena je prisutnost gena koji kodiraju za porfirinazu i agarazu, a koji nisu pronađeni u mikrobiomima drugih populacijskih skupina. Pretpostavlja se da je mikrobiota (*Bacteroides plebeius*) populacije u Japanu stekla ove

gene od morskih bakterija (*Zobellia galactanivorans*) putem prehrane koja uključuje alge (Hehemann i sur., 2010). Ovo jasno ukazuje na činjenicu da prehrana ima neizmjenno važan utjecaj na sastav mikrobiote.

Nadalje, u kontekstu prehrane, valja spomenuti da određeni metaboliti, kao krajnji produkti razgradnje određenih namirnica, mogu biti štetni po zdravlje domaćina. Npr., L-karnitin, kolin i fosfatidilkolin koji se nalaze u crvenom mesu, metaboliziraju se do trimetilamin N-oksida (TMAO) koji potiče upalne procese, oksidaciju LDL te povećava rizik nastanka tromboze agregacijom trombocita. Uz to, uključen je u patogenezu kronične bubrežne bolesti i dijabetesa tipa 2 (Roager i Licht, 2018).

2.5.2. Antibiotici

Prošlog stoljeća jedno od važnijih medicinskih i farmakoloških postignuća bilo je otkriće antibiotika. Danas, gotovo 100 godina kasnije, rezistencija na antibiotike (sposobnost bakterija da razviju otpornost na njihovo djelovanje – što otežava liječenje infekcija te povećava rizik od komplikacija) predstavlja ozbiljan globalni problem u medicini (Ventola, 2015). Bakterije horizontalnim transferom gena imaju sposobnost prenijeti genetički materijal, a time i svojstva te određene funkcije, u ovom slučaju otpornost na antibiotike. Također, antibiotici imaju znatan negativan učinak na korisne članove crijevne mikrobiote. Njihova upotreba dovodi do poremećaja u ravnoteži i raznovrsnosti bakterijskih zajednica koje imaju povoljan utjecaj na zdravlje domaćina. To može dovesti do smanjenja njihove sposobnosti da inhibiraju patogene; do gubitka već spomenutih funkcija mikrobiote (razgradnja hrane, sinteza važnih molekula, održavanje crijevne barijere) kao i ponovnog razvitka infekcije i s time povezanih bolesti (Klingensmith i Coopersmith, 2016).

Jedno je istraživanje pokazalo kako čak i kratkotrajan, sedmodnevni unos antibiotika širokog spektra djelovanja i djelovanjem na anaerobne bakterije (npr. klindamicin), može ostaviti dugoročni učinak (do dvije godine) na mikrobiotu narušavajući raznovrsnost *Bacteroides* vrsta (Jernberg i sur., 2007). Nadalje, upotreba klaritromicina kod infekcije *H. pylori* smanjuje broj *Actinobacteria* (Jakobsson i sur., 2010), dok vankomicin smanjuje broj *Bacteroidetes*, *Fuminococcus* i *Faecalibacterium* (Vrieze i sur., 2014). Zanimljivo je i istraživanje koje je pokazalo pad mikrobne raznovrsnosti za 25% kao utjecaj sedmodnevnog unosa ciprofloksacina i beta-laktama (Panda i sur., 2014).

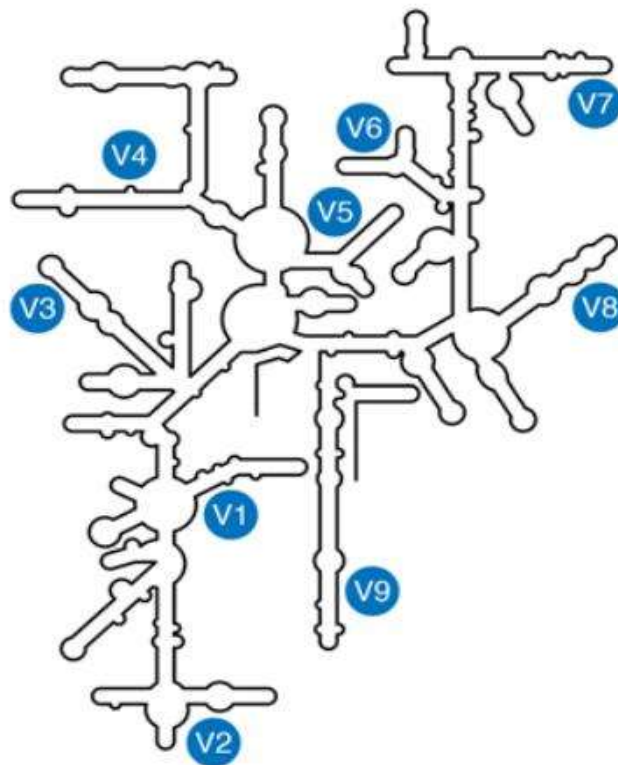
2.6. METODE SEKVENCIRANJA S CILJEM ODREĐIVANJA SASTAVA MIKROBIOTE

Karakteristika je ljudskih genoma da se gotovo u potpunosti sastoje od istih gena, a razlike među jedinkama najčešće se nalaze u regulatornim dijelovima genoma. S druge strane, dva soja bakterije *E. coli* međusobno mogu biti daleko različitija nego što su to npr. ljudi i čimpanze – budući da se gotovo 20 % gena može nalaziti u jednom soju, ali ne i u drugom (Rasko i sur., 2008). Kao posljedica ubrzanog razvoja metoda sekvenciranja, prokariotski genomi danas mogu biti sekvencirani neovisno o kultivaciji, u kratkom vremenu i o relativno niskom trošku; a sve u cilju identifikacije, istraživanja raznovrsnosti mikrobiote, razlikovanja patogenih od nepatogenih genotipova, traženja zajedničkih gena prisutnih u mikroorganizmima od interesa (engl. *core set of genes*) itd. (Snipen i Liland, 2015). Metode sekvenciranja nove generacije (engl. *next-generation sequencing* (NGS)) uključuju sekvenciranje amplikona, *shotgun* metagenomsko sekvenciranje te sekvenciranje RNA (Wensel i sur., 2022).

2.6.1. Sekvenciranje amplikona

U početku svakog istraživanja ključna je identifikacija mikroorganizama od interesa. Danas se u tu svrhu u mnogobrojnim istraživanjima raznih okolišnih uzoraka (poput crijevne mikrobiote, vode, tla i drugih) primjenjuje metoda sekvenciranja amplikona 16S rRNA gena. Ovaj se 1500 nukleotida dugačak gen nalazi u svim prokariotima, a karakterizira ga visok stupanj konzerviranosti; drugim riječima, ne dolazi do pojave mutacija ili se one pojavljuju vrlo sporo tj. rijetko. To je i očekivano obzirom da je 16S rRNA molekula dio ribosoma te time važan dio esencijalnog procesa translacije. Međutim, neki od elemenata sekundarne strukture visoko su varijabilni (točnije njih 9; prigodno nazvanih V1-V9) (Slika 1) odnosno u tim regijama tijekom vremena češće dolazi do pojave mutacija u usporedbi s konzerviranim regijama. Varijabilne su regije stoga one koje se nakon umnažanja PCR-om (engl. *Polymerase chain reaction*) podvrgavaju sekvenciranju. Prilikom toga posebnu pozornost valja obratiti na odabir PCR početnica (engl. *primer*). One se mogu konstruirati na način da se vežu na konzervirane regije s ciljem amplifikacije varijabilne regije između njih. Kako bi se uštedjelo na vremenu i troškovima, najčešće se amplificiraju dvije varijabilne regije (Wensel i sur., 2022). Međutim, istraživanjem cijelog 16S rRNA gen može se naravno postići bolja rezolucija (Johnson i sur., 2019).

Primjenjujući navedene značajke varijacija u konzerviranim i varijabilnim regijama, moguće je odrediti evolucijsku bliskost ili udaljenost, odnosno taksonomsku klasifikaciju članova određene mikrobne zajednice (Hornung i sur., 2018). Taksonomska se identifikacija potvrđuje računalnim poravnanjem prema referentnim 16S rRNA sekvencama, koje se nalaze u bazama poput Ribosomal Database Project (RDP) (Cole i sur., 2014), SILVA (Quast i sur., 2013) ili Greengenes (DeSantis i sur., 2006). Daljnja obrada podataka vrši se preko platformi poput QIIME 2 i NG-Tax (Poncheewin i sur., 2020).



Slika 1. Shematski prikaz 16S rRNA s označenim hipervarijabilnim (V1-V9) regijama (Wensel i sur., 2022)

Pritom, ako dva ili više cjelokupna rRNA gena pokazuju više od 97 % sličnosti u sekvencama, smatra se da pripadaju istoj vrsti. Broj od 97 % navodi se iz povijesno-empirijskih razloga jer se podudara s rezultatima DNA-DNA hibridizacije (Stackebrandt i sur., 1994). Ovi se klasteri koji pokazuju sličnost od 97 % (odnosno do 3 % različitosti) nazivaju *operational taxonomic units* (OTUs). Nadalje, sličnosti čije su vrijednosti između 80 i 95 % definiraju rod i koljeno. Ovdje valja nadodati da OTUs potencijalno imaju sklonost neprepoznavanja vrlo malih, ali prisutnih

razlika između vrsti ili soja. Iz tog je razloga ova vrijednost s vremenom promijenjena na 98,7 % (Kim i sur., 2014). Međutim, čak i kod ove povišene razine sličnosti rezolucija je ograničena za klasifikaciju vrsta određenih filogenetskih grupa (Janda i Abbott, 2007). DADA2 nedavno je razvijen algoritam koji generira tzv. *Amplicon Sequence Variants* (ASVs), u većoj mjeri reprezentativne sekvence (Liu i sur., 2021) koje se oslanjaju na stvarne razlike, a ne na pretpostavljene sličnosti.

2.6.2. *Shotgun* metagenomsko i RNA sekvenciranje

U usporedbi sa sekvenciranjem amplicona, *shotgun* metagenomsko i RNA sekvenciranje analiziraju svu DNA odnosno RNA iz uzorka. *Human microbiome project* (HMP) spomenut ranije u ovom radu primjer je metagenomskog istraživanja, a sličan pristup ima i MetaHit (Gut Microbiota for Health, 2023). Metagenomsko sekvenciranje, nakon izolacije, uključuje fragmentiranje cjelokupne DNA iz uzorka na mnogo manje fragmente. Pritom na krajeve pojedinog fragmenta dolazi do ligiranja tzv. barkodova i adaptera, a kako bi se olakšala identifikacija i DNA sekvenciranje. Referentne baze podataka koje se najčešće koriste za poravnanja su Reference Sequence (RefSeq) i GenBank. Analiza podataka koja slijedi svakako nije jednostavna te zahtjeva sofisticirane računalne alate. Osim toga, interpretacija rezultata može biti složena, osobito za mikroorganizme čije su funkcije manje poznate (Hornung i sur., 2018).

Tijek procesa kod RNA sekvenciranja sličan je onome kod *shotgun*; međutim, nakon fragmentacije slijedi reverzna transkripcija RNA segmenata u komplementarnu DNA (cDNA), uz primjenu PCR-a.

2.6.3. Usporedba metoda sekvenciranja

Zbog razlika u metodologijama, 16S rRNA amplicon, *shotgun* metagenomsko i RNA sekvenciranje imaju svoje prednosti i nedostatke. Potonja svakako zahtjeva veću pozornost na stabilnost uzoraka. No, omogućuje analizu mikrobne aktivnosti i dinamike, kao i funkcionalnost te istraživanje RNA virusa (Wensel i sur., 2022). *Shotgun* metagenomsko sekvenciranje pruža cjelovitu genomsku informaciju o svim mikroorganizmima prisutnima u uzorku (bakterija, virusa, gljivica) pa tako i o onima koji su dosad nepoznati tj. potencijalno novi. Osim toga, pruža analizu metaboličkih puteva i funkcionalnih gena. Međutim, zahtjeva više računalne obrade, pa tako i vremena i resursa. Što se tiče navedene analize funkcionalnosti; valja naglasiti da *shotgun*

metagenomsko sekvenciranje pruža uvid u sve gene prisutne u mikroorganizmima u datom uzorku te tako pruža pretpostavljeni funkcijski potencijal. S druge strane, RNA sekvenciranje omogućava uvid u to koji od prisutnih gena su aktivno transkribirani te time pruža informaciju o aktivnom funkcijskom profilu (Wensel i sur., 2022). Obje su metode visoko razlučive – omogućuju klasifikaciju do vrste i soja.

16S rRNA sekvenciranje relativno je brza i relativno povoljna (20-50\$ po uzorku (Liu i sur., 2021)) metoda te pruža uvid u mikrobnu raznolikost i identifikaciju. Međutim, karakterizira ju manja rezolucija i osjetljivost – taksonomska klasifikacija najčešće je moguća samo do razine roda (Jovel i sur., 2016); ne pruža cjelovitu informaciju o funkcionalnim svojstvima mikrobiote (obzirom da je temeljena na samo jednom genu) te je ograničena na bakterijske organizme. No, zbog potonje karakteristike kod ove je metode u odnosu na prve dvije manja vjerojatnost pojave kontaminacije (16S rRNA gen specifičan je za bakterije). Osim toga, bioinformatička analiza brža je i manje zahtjevna zbog manje količine generiranih podataka (Liu i sur., 2021) (jedan gen u odnosu na cjelokupan set gena) te zbog javno dostupnih platformi koje olakšavaju daljnju analizu (Wensel i sur., 2022), poput ranije navedenog i u ovom radu korištenog QIIME-a.

Izbor metode sekvenciranja ovisi o karakteristikama mikrobne zajednice koja se proučava, raspoloživim resursima te naravno o ciljevima samog istraživanja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio provodio se u više koraka: prikupljanje uzoraka, ekstrakcija DNA iz smrznutih uzoraka, izrada knjižnice odnosno provedba PCR-a kako bi se umnožile varijabilne V3-V4 regije, sekvenciranje uz Illumina MiSeq uređaj te obrada podataka uz QIIME 2 program.

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Pribor

- metalne špatule
- staklene čaše
- automatske pipete
- plastične posude s poklopcima za uzorke
- Falcon kivete
- epruvete raznih veličina
- stalak za epruvete
- stalak za kivete
- Microseal 'A' filmovi (Bio-Rad, part # MSA-5001) – Labena, Hrvatska
- PCR ploče s 96 jažica (Bio-Rad, part # MSA-9601) – Inel, Hrvatska

3.1.2. Kemikalije

- natrijev hidroksid
- etanol
- TAE pufer – Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- Agaroz – Sigma Aldrich, SAD, zastupnik Kefo, Hrvatska
- 1 kb DNA Ladder GeneRuler Thermo Fisher Scientific
- Tris (10 mM, ph = 8,5) – Kefo, Hrvatska
- Qubit dsDNA BR Assay Kit – Thermo Fisher Scientific, SAD
- SYBR Safe DNA gen stain – Invitrogen, zastupnik Biosistemi, Hrvatska
- MiliQ voda (slijepa proba kod provedbe PCR)
- HT1 hibridizacijski pufer – Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- MiSeq Reagent Kit v3 (600 ciklusa) – Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- PhiX Control Kit v3 (FC-110-3001) – Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska

- amplikon PCR prednje početnice – Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- amplikon PCR stražnje početnice – Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- 2x KAPA HiFi Hotstart Ready Mix (KAPA Biosystems) – Roche, Njemačka, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- Nextera XT Index 1 (N7XX) i Index 2 (S5XX) početnice – Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- Agencourt Ampure XP 60 ml Kit – Beckman Coulter, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska

3.1.3. Uređaji

- QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit – Qiagen, Njemačka
- Illumina MiSeq System SY-410-1003 – Illumina, SAD, zastupnik Kemomed, Hrvatska
- analitička vaga – AXIS ALN, zastupnik Server-mark, Hrvatska
- centrifuga – Thermo Scientific, SAD, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- tresilica – Thermo Scientific, SAD, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- vortex – Thermo Scientific, SAD, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- Thermal cycler – Thermo Scientific, SAD, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- transiluminator
- Qubit 3.0 fluorimetar – Thermo Scientific, SAD, zastupnik Asolutic, Hrvatska
- Elektroforetski uređaj – Electrophoresis Power Supply 150/2000, Elchrom Scientific

3.2. METODE

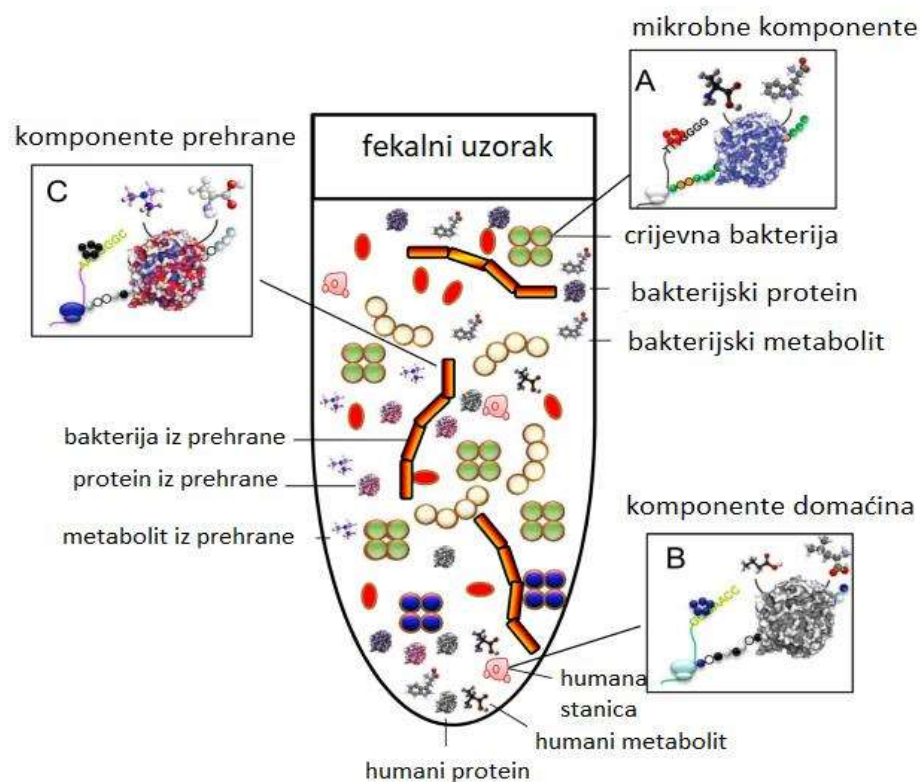
3.2.1. Prikupljanje uzoraka

Nakon informiranog pristanka, 59 fekalnih uzoraka prikupljeno je od strane dobrovoljaca koji predstavljaju radno-aktivnu populaciju u Zagrebu (Prehrambeno-biotehnološki fakultet i Institut za antropologiju). Uzorci su neposredno smrznuti te je nakon završenog prikupljanja započet postupak ekstrakcije DNA.

3.2.2. DNA ekstrakcija i određivanje koncentracije DNA

U svrhu DNA ekstrakcije upotrijebljen je QIAamp PowerFecal DNA Kit (QP; Qiagen, Hilden, Njemačka) za izolaciju DNA. Postupak je izolacije efikasan i jednostavan te se provodio prateći upute proizvođača (<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=8896817a->

253f-4952-b845-0aab796813ce&lang=en). Približno 0,25 g pojedinog uzorka (Slika 2) uzeto je i prebačeno u prethodno numerirane epruvete s granulama (engl. *bead tubes*). Dodatkom otopina iz kita, zagrijavanjem i vorteksiranjem – kombinacijom dakle kemijskih agenasa i mehaničkih sila – omogućena je homogenizacija uzoraka i liza stanica koje se nalaze u uzorcima. Daljnjim slijedom otopina omogućeno je taloženje organskog i anorganskog materijala koji nije DNA – polisaharidi, ostaci stanica, proteini, itd. Ovaj je korak važan u svrhu dobivanja što čišće DNA te osiguravanja bolje kvalitete ishoda daljnjih koraka u eksperimentu. Dodatkom otopine visoke koncentracije soli omogućeno je vezanje DNA na silika membranu spin kolone. Potom se uz otopinu koja sadrži etanol provelo ispiranje ostataka soli, inhibitora i ostalih kontaminanata te time osigurala dodatna čistoća DNA već vezane na silika gel. Ostaci etanola (koji bi potencijalno mogao interferirati u *downstream* procesima kao što je PCR) uklonjeni su pomoću naknadnog centrifugiranja. Konačno, uz pomoć 10 mM Tris otopine, omogućena je elucija DNA vezane na silika gel.



Slika 2. Shematski prikaz kompleksnosti fekalnih uzoraka koji se sastoje od mikrobnih (A), domaćiniovih (B) i komponenata iz prehrane (C) (prema Rojo i sur., 2017)

Nakon izolacije DNA uslijedilo je određivanje koncentracije DNA koje se provelo uz pomoć fluorimetra Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, SAD) (Slika 3). Ovaj je korak važan kako bi se osiguralo da je prisutna dovoljna koncentracija DNA koja je potrebna za pripremu knjižnice. Fluorimetrijske metode temelje se na specifičnom vezanju DNA s fluorescentnim bojama. Qubit reagens u kojem se nalazi fluorescentna boja razrijedio se u Qubit puferu. Pripremljeni reagens dodao se otopinama DNA nepoznatih koncentracija, kao i standardima (otopine DNA poznatih koncentracija). Uzorci su kratko vorteksirani te inkubirani pri sobnoj temperaturi 2 minute. Potom je očitavana fluorescencija uzoraka, a signal je proporcionalan količini DNA čija se koncentracija računa ovisno o volumenu analiziranog uzorka.

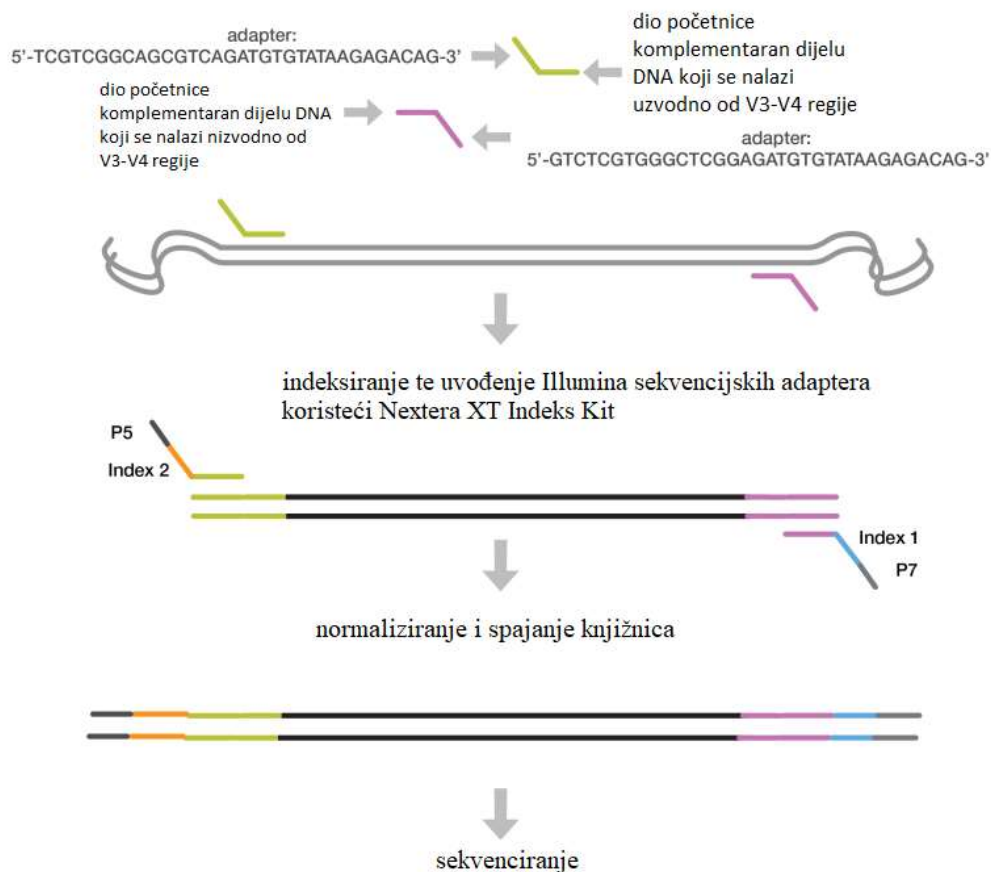


Slika 3. Qubit 3.0 fluorimetar (Thermo Fisher Scientific, 2023)

3.2.3. Izrada DNA knjižnice i sekvenciranje

Cilj je ovog koraka umnožiti V3-V4 regije 16S rRNA gena potrebne za kasniji proces sekvenciranja (Slika 4). To je učinjeno prema uputama proizvođača za tijek ovog postupka – *Priprema DNA knjižnice za 16S metagenomsko sekvenciranje* (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf). PCR amplifikacija ciljane regije izvedena je pomoću KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (2x) (Roche, Mannheim, Njemačka). U tu je svrhu korišten par amplikonskih početnica preporučenih od strane Illumine. Početnice su dijelom komplementarne dijelovima DNA uzvodno i nizvodno od V3-V4 regija, a dijelom sadrže tzv. adaptore: 5'-

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTACGGGNGGCWGCAG-3' i 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'. Reakcijska smjesa od ukupno 25 μL tako je sadržavala: 2,5 μL mikrobnog DNA (u koncentraciji 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 5 μL svake od početnica (svaka koncentracije 1 μM) te 12,5 μL KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (2x). PCR amplifikacija izvršena je uz sljedeće uvjete: inicijalna denaturacija 3 minute na 95 $^{\circ}\text{C}$; potom ciklus u cilju denaturacije, vezanja početnica i produljivanja (30 sekundi na 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 sekundi na 55 $^{\circ}\text{C}$ i 30 sekundi na 72 $^{\circ}\text{C}$) ponovljen 25 puta; zatim završno produljivanje 5 minuta na 72 $^{\circ}\text{C}$ te zadržavanje na 4 $^{\circ}\text{C}$. Uzorci su potom utvrđeni na 2 % agaroznom gelu (1 g agaroze, 50 μL TAE pufera (Tris/acetat/EDTA), 3 μL SYBR Green boje).



Slika 4. Tijek procesa amplifikacije 16S V3-V4 regija: PCR reakcijom amplificira se dio genomske DNA koristeći specifične početnice koje sadrže adaptore i koje su komplementarne dijelovima DNA nizvodno i uzvodno od V3-V4 regije (*prema* Illumina, 2023)

Nakon toga, koristeći AMPure XP granule (Beckman Coulter, SAD) PCR produkti tj. 16S V3-V4 ampliconi pročišćeni su od slobodnih početnica i onih koje su formirale dimere. Uslijedilo je tzv. indeksiranje te uvođenje Illumina sekvencijskih adaptera uz ponovnu PCR amplifikaciju koristeći Nextera XT Indeks Kit (Illumina, SAD). Ova PCR reakcijska smjesa sadržavala je ukupno 50 µL: 5 µL DNA, po 5 µL svake od dvije Nextera XT Indeks početnice, 25 µL KAPA Hifi Hot Start Ready Mix (2x) te 10 µL vode. PCR uvjeti bili su isti kao u prvom ciklusu s razlikom što je u drugom koraku ciklus ponovljen 8 puta (a ne 25). Nakon toga, ponovljen je proces pročišćavanja uz AMPure XP granule. Produkti su zatim kvantificirani i u jednakim koncentracijama udruženi. Prema uputama proizvođača na ovaj način udružene knjižnice denaturirane su uz NaOH, razrijeđene puferom te denaturirane visokom temperaturom. Potom su podvrgnute *paired-end* 2 x 300 bp sekvenciranju prateći Illumina MiSeq upute (Slika 5).



Slika 5. Illumina MiSeq uređaj (Illumina, 2023)

3.2.4. Analiza podataka uz QIIME 2

U svrhu dobivanja rezultata o taksonomskoj podjeli, podaci koji su dobiveni nakon sekvenciranja obrađeni su uz QIIME 2 (engl. *Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2*) (<https://qiime2.org/>). QIIME 2 bioinformatički je javno dostupan alat koji se upotrebljava za interpretaciju i analizu podataka dobivenih sekvenciranjem mikrobiote, pa tako i *pair-end* 16S rRNA sekvenciranja koje je provedeno u ovom radu. U prvom koraku podaci sekvenciranja

uneseni su u QIIME 2 u FASTQ formatu (standardni, tekstualni format za pohranjivanje sekvenci, gdje Q predstavlja kvalitetu očitavanja). Podaci dolaze u dvije zasebne datoteke gdje se u jednoj nalazi sekvenca u prednjem (engl. *forward*), a u drugoj u stražnjem načinu očitavanja (engl. *reverse*). Tijekom postupka pripreme knjižnice u svaki je uzorak bio implementiran specifičan barkod te su zatim svi uzorci zajedno sekvencirani. Izlazni podaci nakon toga su *multipleksirani*, pa je potrebno izvršiti njihovo razdvajanje (engl. *demultiplexing*) odnosno razvrstavanje na temelju barkodova, koji se kasnije također uklanjaju zajedno s početnicama. Slijedi proces pripajanja prednjeg i stražnjeg očitavanja te uklanjanja (engl. *trimming*) nukleotida koji nisu zadovoljili minimalne kriterije kvalitete. Cilj je ovih postupaka povećati količinu izlaznih podataka visoke kvalitete. Odabir onih sekvenci koje su reprezentativne pojedinoj taksonomskoj grupi sljedeći je vrlo važan korak. Uz DADA2 algoritam spomenut ranije u ovom radu, provodi se ispravljanje pogrešaka koje se nalaze u sekvencama (engl. *denoising*). Slične sekvence potom su klasterirane u ASVs (engl. *Amplicon sequence variants*) u obliku tablice te je uslijedilo uspoređivanje sa sekvencama iz baza podataka. Konačne datoteke dobivene su u qzv (QIIME Zipped Visualization) formatu. Rezultati svih postupaka provedenih u QIIME 2 mogu se vizualizirati grafičkim prikazima i pripadajućim statističkim podacima (<https://view.qiime2.org/>). USEARCH (Liu i sur., 2020), Mothur, Phyloseq, MICCA (Hornung i sur., 2018) te u ovom radu ranije spomenuti NG-Tax neke su od poznatih platformi koje se također mogu koristiti u ove svrhe.

4. REZULTATI I RASPRAVA

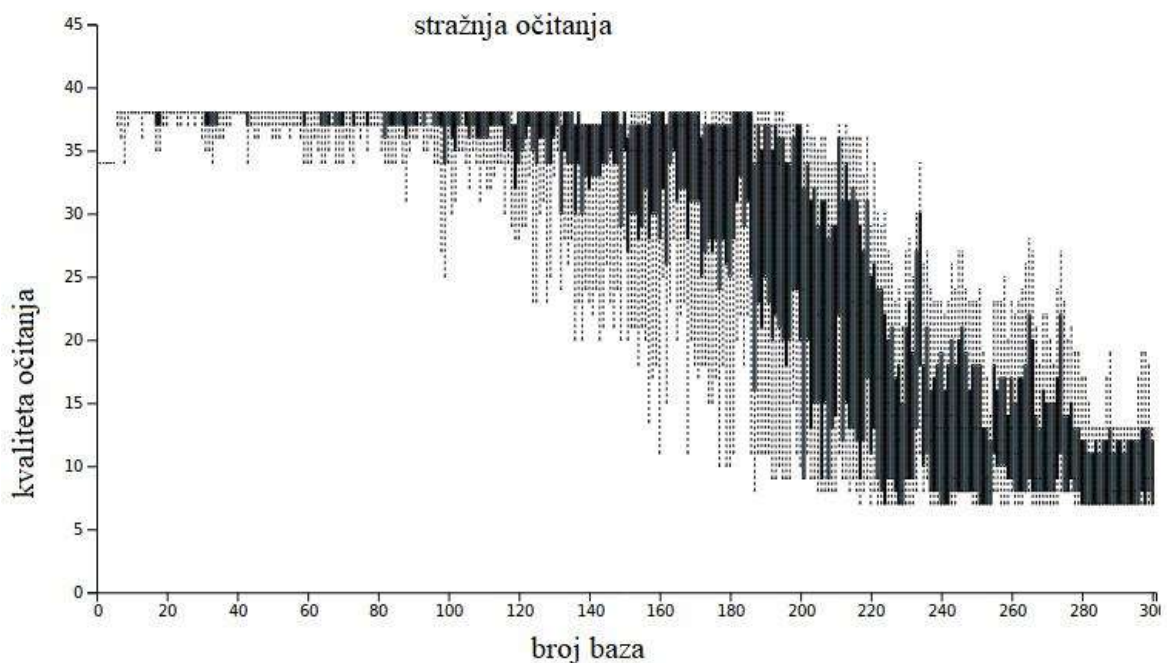
Cilj je ovog rada bio usporediti sastav crijevne mikrobiote ispitanika koji predstavljaju populaciju u gradu Zagrebu s drugim populacijskim skupinama. Ukupno je prikupljeno 59 uzoraka od strane zaposlenika (u dobi od 18 do 59 godina) Instituta za antropologiju i Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Laboratorijski dio proveden je u Institutu za antropologiju. Cjelokupna DNA izolirana je iz fekalnih uzoraka, umnoženi su V3-V4 dijelovi 16S rRNA gena prokariota te sekvencirani uz Illumina MiSeq uređaj. Rezultati sekvenciranja potom su obrađeni i analizirani uz bioinformatički alat QIIME 2.

Utjecaj crijevne mikrobiote na zdravlje ljudi danas je od neupitne važnosti. Istraživanja njenog sastava i uloge omogućeno je među ostalim razvitkom tehnologije sekvenciranja DNA. Pritom varijabilni dijelovi 16S rRNA gena mogu služiti kao markeri koji se uspoređuju s već poznatim i ranije sekvenciranim genomima mikroorganizama te je na taj način moguće odrediti koji se mikroorganizmi nalaze u određenom uzorku. Međupopulacijska usporedba sastava crijevne mikrobiote važna je kako bi se odredilo koji su članovi crijevne mikrobiote prisutni kod svih zdravih pojedinaca, a koji kod potencijalnih bolesti i specifičnih zdravstvenih stanja. Ova su temeljna istraživanja među ostalim važna zbog liječenja istih. No, činjenica da mnogobrojni čimbenici utječu na sastav crijevne mikrobiote, poput genetike, prehrane i drugih okolišnih faktora, čini ova istraživanja vrlo složenima.

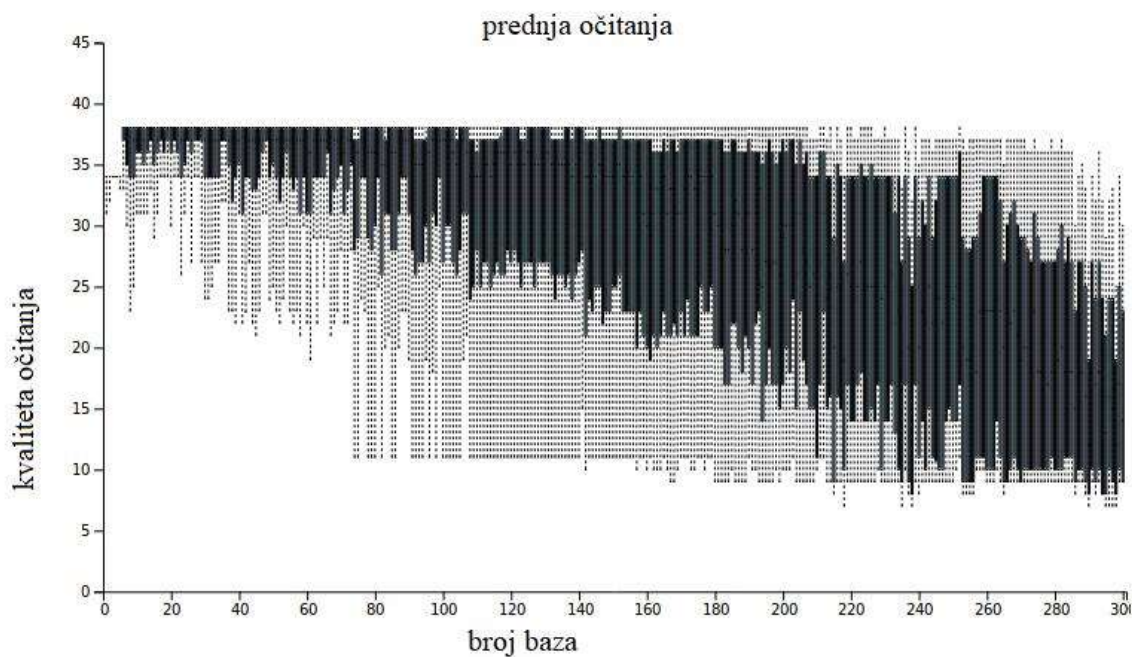
Rezultati bioinformatičke analize prikazani su upotrebom vizualizacija .qzv dokumenata u QIIME 2 View-u, dok su za taksonomsku zastupljenost upotrjebljeni stupčasti dijagrami.

4.1. PROVJERA KVALITETE ULAZNIH SEKVENCI

U analizi podataka 16S rRNA sekvenciranja kontrola kvalitete vrlo je važna kako bi se procijenila pouzdanost rezultata sekvenciranja. Provjera je izvršena za 10 000 nasumično odabranih ulaznih sekvenci iz uzorka. Naime, izračun provjere za sve ulazne sekvence vremenski bi bio iscrpan. Zbog nasumičnog uzorkovanja u slučaju ponovnog generiranja provjere s istim sekvencijskim podacima dobili bi se neznatno različiti izračuni. Dijagrami raspodjele kvalitete očitavanja (stražnjih i prednjih) za svaku poziciju u ulaznim sekvencama prikazani su na slikama 6 i 7. Ovi interaktivni dijagrami služe utvrđivanju postoji li i na kojoj poziciji u sekvencama određen pad u kvaliteti prema broju baza. U svrhu omogućavanja uspješnog spajanja stražnjeg i prednjeg očitavanja, cilj je zadržati što je više moguće baza. Istovremeno, potrebno je izbaciti one baze koje su niskih kvaliteta kako bi se osigurali što kvalitetniji rezultati.



Slika 6. Dijagram raspodjele kvalitete nasumično odabranih sekvenci stražnjih očitavanja prema broju baza

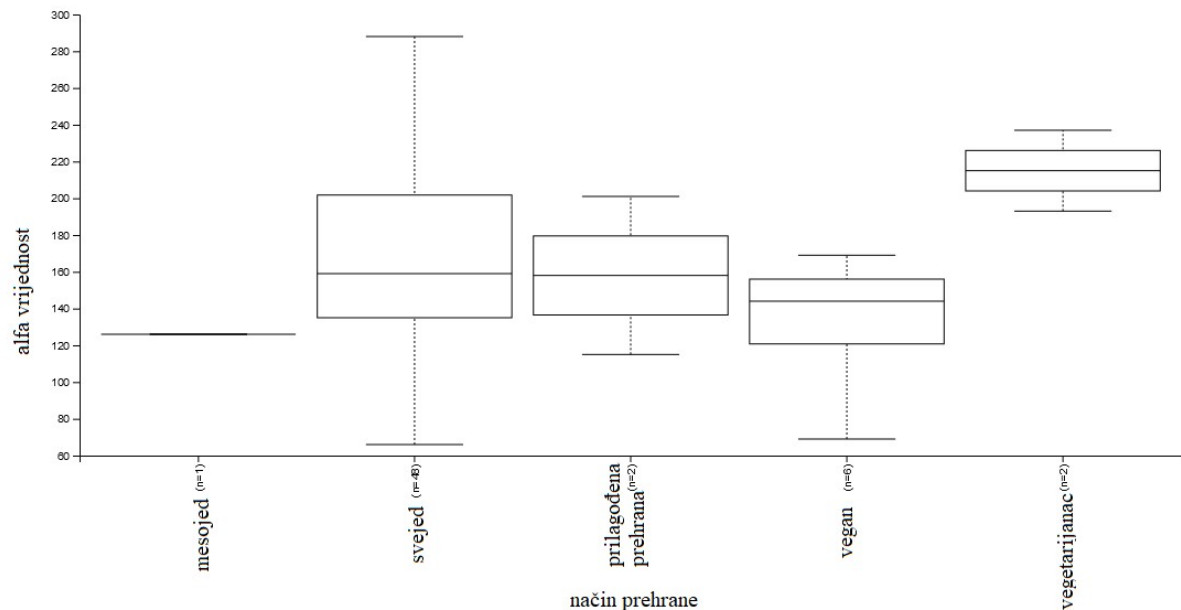


Slika 7. Dijagram raspodjele kvalitete nasumično odabranih sekvenci prednjih očitavanja prema broju baza

4.2. ALFA I BETA RAZNOLIKOST

Alfa raznolikost kvantitativno predstavlja raznovrsnost mikrobne zajednice unutar određenog uzorka te time pruža uvid u ravnotežu i bogatstvo mikrobiote. Niska vrijednost alfa raznolikosti može upućivati na disbiozu crijevne mikrobiote, a potencijalno time i na bolesti kao što je opisano ranije u ovom radu. Najčešće se izračunava uz različite metrike poput *observed_otus* koja daje informacije o broju jedinstvenih taksonomskih grupa unutar određenog uzorka. U promatranoj populaciji prosječan broj vrsta koje se nalaze u crijevnoj mikrobioti pojedinca iznosi 165. Na slici 8 prikazana je alfa raznolikost ovisna o pet načina prehrane ispitanika – mesojed, svejed, ispitanici s prilagođenom prehranom te vegan i vegetarijanac. Horizontalna linija predstavlja medijan vrijednosti otkrivenih taksonomskih grupa unutar uzoraka. Najviše vrijednosti alfa raznolikosti uz najmanji raspon odnosno varijabilnost unutar jednog načina prehrane vidljiv je kod skupine vegetarijanaca, što je u skladu s istraživanjima koja su pokazala povoljan utjecaj biljne prehrane na crijevnu mikrobiotu (Gupta i sur., 2017). Osim toga, vidljivo je da je najveća razina alfa raznolikosti određena kod ispitanika koji su svejedi. To je i očekivano obzirom da je istraživanjima potvrđeno da raznovrsna prehrana

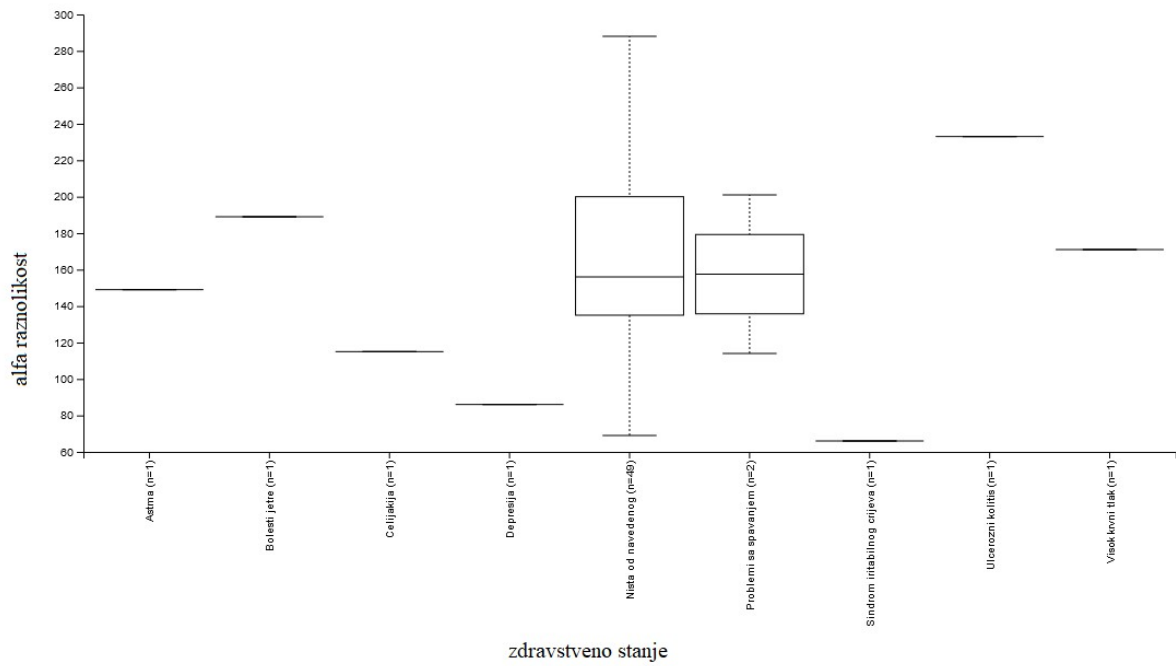
pogoduje raznolikijem sastavu mikrobiote (Heiman i Greenway, 2016). Istovremeno, u toj je skupini vidljiv i najveći raspon vrijednosti odnosno varijabilnost unutar skupine.



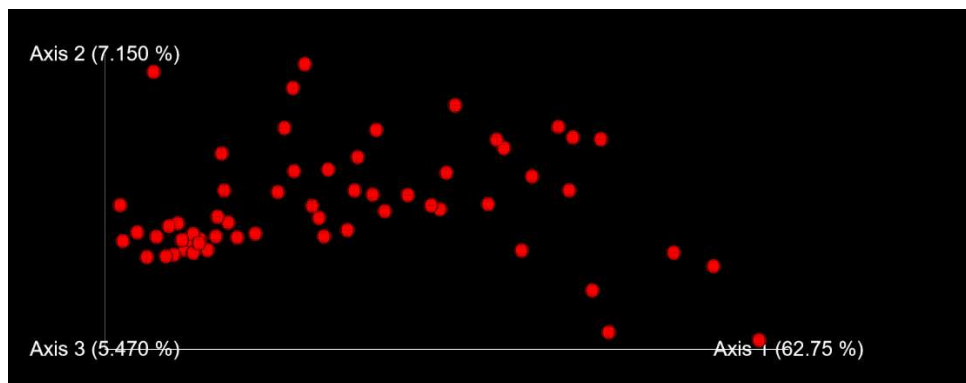
Slika 8. Prikaz alfa raznolikosti ovisno o načinu prehrane ($p > 0,05$)

Na slici 9 prikazana je alfa raznolikost ovisna o specifičnim zdravstvenim stanjima. Ovdje valja istaknuti da je alfa vrijednost najviša kod zdravih pojedinaca, a najmanja kod ispitanika sa sindromom iritabilnog crijeva, a potom depresijom i celijakijom.

Beta raznolikost predstavlja mjeru o filogenetičkoj različitosti odnosno sličnosti između promatranih uzoraka, a određuje se UniFrac težinskom i netežinskom metrikom. Potonja ispituje prisutnost određene bakterije (kvalitativnost); a težinska uz to i zastupljenost (kvantitativnost). Kako bi se vizualizirao dijagram, iz QIIME-a je generiran PCoA prikaz (engl. *Principal Coordinate Analysis*). Pritom, manja udaljenost označava veću sličnost među uzorcima. Na slici 10 prikazana je težinska beta raznolikost svih promatranih uzoraka.



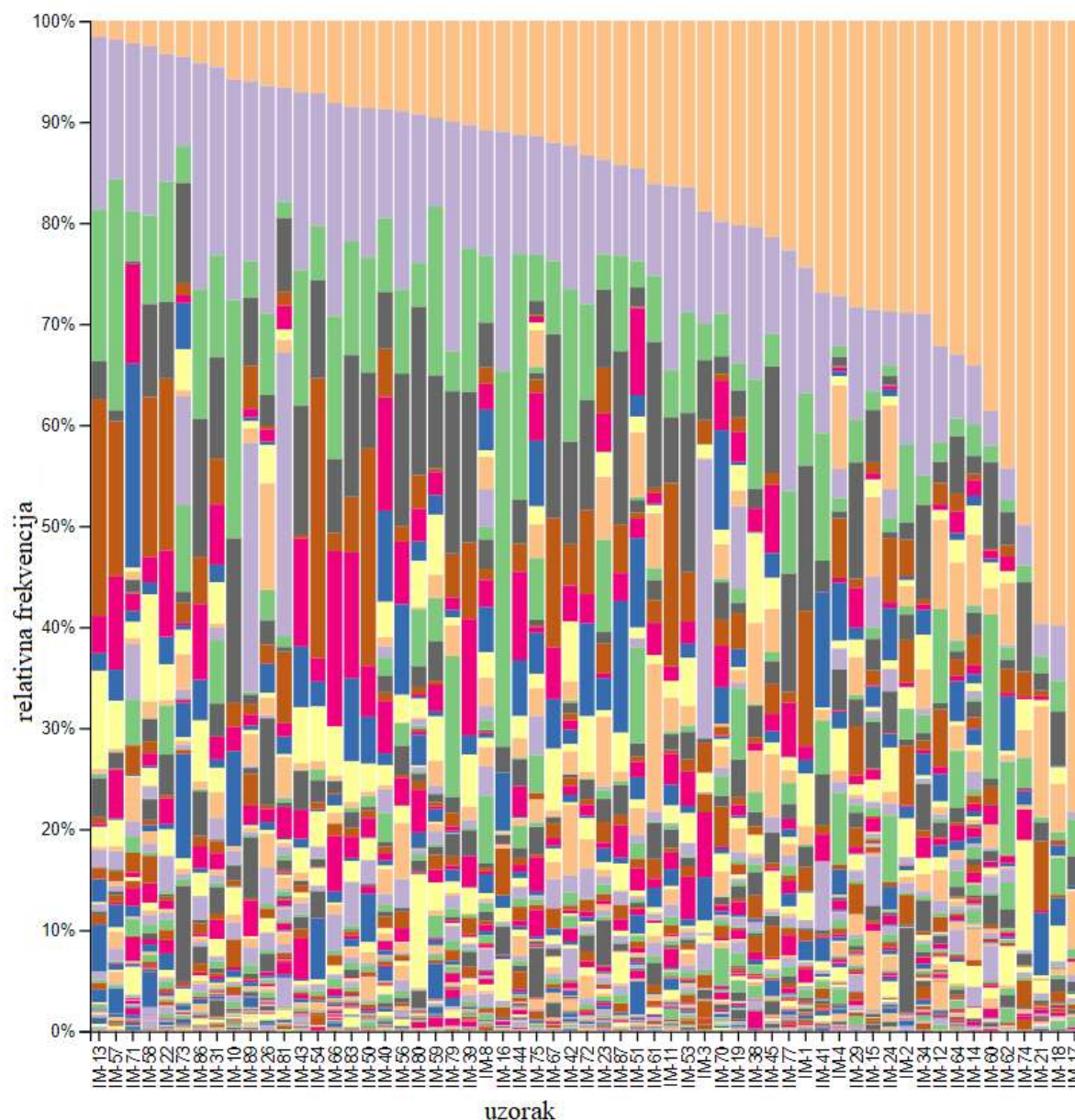
Slika 9. Prikaz alfa raznolikosti ovisno o zdravstvenom stanju ($p > 0,05$)



Slika 10. PCoA prikaz beta raznolikosti određenog težinskom UniFrac metrikom za sve promatrane uzorke

4.3. TAKSONOMSKA ZASTUPLJENOST BAKTERIJA

Informacije obrade podataka sekvenciranja u QIIME 2 proizlaze u obliku biom tablice (CSV format) u kojoj se nalaze informacije vezane za taksonomske jedinice i njihov udio prisutan u uzorcima, a podaci se mogu prenijeti u .xlsx format (Excel tablica). Analizom je omogućena razlučivost pregleda taksonomije do razine roda, a stupčasti dijagram prema porastu zastupljenosti *Bacteroides* roda prikazan je na slici 11.



d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Blautia
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaceae;g__Faecalibacterium
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Agathobacter
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaceae;g__Ruminococcus
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaceae;g__Subdoligranulum
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae;g__Alistipes
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Prevotellaceae;g__Prevotella
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;g__
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__[Ruminococcus]torques_group
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Tannerellaceae;g__Tannerella
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Peptostreptococcales-Tissierellales;f__Peptostreptococcaceae;g__
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Oscillospiraceae;g__UCG-002
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Roseburia
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Collinsella
d__Bacteria;p__Verrucomicrobiota;c__Verrucomicrobiae;o__Verrucomicrobiales;f__Verrucomicrobiaceae;g__uncultured
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Barnesiellaceae;g__Barnesiella
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelatoclostridiaceae;g__Erysipelatoclostridium
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Lachnospira
d__Bacteria;p__Firmicutes;g__
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Tannerellaceae;g__Parabacteroides
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Christensenellales;f__Christensenellaceae;g__Christensenellaceae_R-7_group
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Oscillospiraceae;g__Colidextribacter
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaceae;g__uncultured
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Negativicutes;o__Veillonellales-Selenomonadales;f__Veillonellaceae;g__Dialister
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__[Eubacterium]coprostanoligenes_group;g__[Eubacterium]coprostanoligenes_group
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Streptococcaceae;g__Streptococcus
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;g__
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Anaerostipes
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__Clostridium_sensu_stricto_1
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Monoglobales;f__Monoglobaceae;g__Monoglobus
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Butyricoccaceae;g__Butyricoccus
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridia_UCG-014;f__Clostridia_UCG-014;g__Clostridia_UCG-014
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Lachnoclostridium

Slika 11. Relativna zastupljenost bakterijskih rodova u crijevnoj mikrobioti ispitanika

prikazana stupčastim dijagramom;

d (engl. *domain*) predstavlja carstvo, *p* (engl. *phylum*) koljeno, *c* (engl. *class*) razred, *o* (engl.

ordo) red, *f* (engl. *family*) porodicu, *g* (engl. *genus*) rod;

„_“ označava neidentificiranost slijeda DNA

Razina domene najviša je opisana taksonomska kategorija. Analizom istraživanih uzoraka utvrđena je pripadnost domenama *Archaea* i *Bacteria*, a potonja u zastupljenosti od 99,59 %.

Koljeno je sljedeća taksonomska kategorija nakon domene, a rezultati su pokazali da su tri koljena prisutna u svih 59 uzoraka – *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Actinobacteria*, dok je koljeno *Proteobacteria* prisutno u njih 58. Po nekim istraživanjima, smrzavanje uzoraka prije izolacije DNA utječe na smanjenje zastupljenosti članova *Proteobacteria* (Panek i sur., 2018). *Actinobacteria* treće je najzastupljenije koljeno u ovom istraživanju, a prosječna zastupljenost iznosi 4,87 %. Zastupljenost *Bacteroidetes* koljena u prosjeku iznosi 30,60 %, dok očekivani raspon iznosi 10-60 %, a što je ostvareno u 50 uzoraka. *Firmicutes* koljeno najzastupljenije je – u prosjeku 62,58 %. Očekivani raspon ovog koljena prema literaturi iznosi 20-80 %, a u populaciji promatranoj u ovom istraživanju to je i uočeno u 58 uzoraka. *Firmicutes* i *Bacteroidetes* i po literaturi predstavljaju dva prevladavajuća koljena crijevne mikrobiote zdravih pojedinaca (Gacesa i sur., 2022, Rinninella i sur., 2019).

Nadalje, povećana zastupljenost *Firmicutes* koljena uočena je kod stanovnika Oklahome u SAD-u koju karakterizira *zapadnjački* obrazac prehrane (pretežito konzervirano povrće i voće, kruh, unaprijed zapakirana jela) (Obregon-Tito i sur., 2015). Osim toga, povećana zastupljenost *Firmicutes* koljena zapažena je i kod djece koja žive u Europi i čija je prehrana također sličnog obrasca – bogata životinjskim proteinima, šećerom, škrobom i mastima te niskim udjelom vlakana (De Filippo i sur., 2010).

Osim toga, omjer zastupljenosti *Firmicutes/Bacteroidetes* odnos je koji je prema nekim istraživanjima potencijalni pokazatelj pretilosti i metaboličkih poremećaja. Naime, članovi koljena *Firmicutes* efikasniji su u iskorištavanju energije potičući tako djelotvorniju apsorpciju metabolita te posljedično povećanje tjelesne mase. Gotovo 78 % ispitanih uzoraka ne nalaze se unutar referentnih vrijednosti (1,4-2,1) ovog omjera, a prosjek svih 59 uzoraka iznosi 4,62. Međutim, kod interpretacije ovog omjera valja pripaziti jer postoje istraživanja koja pokazuju kontradiktornost dosad provedenih istraživanja (Magne i sur., 2020). Nadalje, valja naglasiti da je po nekim istraživanjima ovaj omjer podložan pristranosti u rezultatima, a kod uzoraka koji su prije izolacije bili smrznuti (Panek i sur., 2018), kao što je slučaj u ovom radu.

Uz prehranu kao čimbenika koji utječe na sastav mikrobiote, zastupljenost *Firmicutes* koljena istraživana je i kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Zanimljivo, povećana zastupljenost ovog koljena uočena je kod bolesnika u Njemačkoj i Litvi, no ne i u Indiji (Rehman

i sur., 2016), što potencijalno ukazuje međudjelovanje bolesti i drugih čimbenika koji utječu na sastav mikrobiote, a koji su specifični za određene populacije.

Kako je navedeno na početku ovog potpoglavlja, razlučivost ove analize omogućila je pregled do roda kao najniže taksonomske grupe. Ukupno je utvrđeno 200 rodova, a u tablici 2 prikazano je njih 7 najzastupljenijih.

Tablica 2. Prosječno najzastupljeniji rodovi u crijevnoj mikrobioti ispitanika

bakterijski rod	prosječna zastupljenost
<i>Bacteroides</i>	18,58 %
<i>Blautia</i>	7,97 %
<i>Faecalibacterium</i>	7,70 %
<i>Agathobacter</i>	4,51 %
<i>Alistipes</i>	3,04 %
<i>Bifidobacterium</i>	2,98 %
<i>Prevotella</i>	2,03 %

Najviše zastupljeni rod među svim ispitanicima je *Bacteroides* iz *Bacteroidetes* koljena koji je najzastupljeniji u 29 ispitanika, a među uzorcima se pojavljuje u širokom rasponu od 2-78 %. Ovo je u skladu s istraživanjima gdje je rod *Bacteroides* uistinu jedan od najzastupljenijih i dobro proučenih članova crijevne mikrobiote. Članovi roda *Bacteroides* Gram-negativni su te sudjeluju u razgradnji složenih polisaharida producirajući kratkolančane masne kiseline. Yatsunenko i sur. (2012) opisali su povećanu zastupljenost ovog roda kod stanovnika američkih velegradova koji žive industrijaliziranim načinom života i čija je prehrana okarakterizirana kao *zapadnjačka*, a isto je potvrđeno i HMP-om za opću populaciju u SAD-u (Gomez i sur., 2016). Visoka zastupljenost ovog roda uočena je i u Kini (39 %), Danskoj (20 %) i Španjolskoj (23 %) (Nishijima i sur., 2016) (Slika 12 i 13), dok je u zemljama poput Švedske (8 %), Venezuele (3 %) i Perua (1 %) značajno niža (Slika 13) (Nishijima i sur., 2016, Obregon-Tito i sur., 2015, Yatsunenko i sur., 2012).

Drugi rod po zastupljenosti u promatranoj skupini je *Blautia*, a koji je najzastupljeniji kod 8 ispitanika. Također je i po literaturi jedan od najučestalijih mikroorganizama crijevne mikrobiote, Gram-pozitivan je te pripada porodici *Lachnospiraceae* (koljeno *Firmicutes*). Njegova povećana zastupljenost zapažena je kod odraslih osoba u Italiji (Bolonja), a čija prehrana je okarakterizirana *zapadnjačkom*, točnije bogatom namirnicama poput crvenog mesa, peradi, ribe, mliječnih proizvoda i tjestenine (Schnorr i sur., 2014). Kontradiktorno, kod populacije u Japanu, koju karakterizira visoka prosječna životna dob, nizak BMI (engl. *Body Mass Index*) te jedinstven sastav crijevne mikrobiote u usporedbi s drugim populacijama, upravo je rod *Blautia* najzastupljeniji (Nishijima i sur., 2016). Naime, konzumacija određenih tradicionalnih japanskih jela, a koja djeluju kao prebiotici, povezana je s povećanjem zastupljenosti određenih *Blautia* vrsta (Hamajima i sur., 2016). Od Hrvatskoj bližih zemalja, *Blautia* rod dominantan je u Austriji (Nishijima i sur., 2016) (Slika 12).

Sljedeći rod po zastupljenosti je *Faecalibacterium*. Članovi ovog roda Gram-pozitivni su, važni proizvođači butirata, pokazuju protuupalne učinke te služe kao potencijalni probiotici u terapiji bolesti (Rinninella i sur., 2019). Uz to, smanjena zastupljenost ovog roda zapažena je kod mnogih bolesti (Gacesa i sur., 2022, Rinninella i sur., 2019), npr. ulceroznog kolitisa (Falony i sur., 2016). Panek i sur. (2018) istaknuli su sposobnost Illumine MiSeq (korištene i u ovom radu) da detektira upravo ovaj rod. Ovo opažanje potrebno je potvrditi što bi potencijalno bilo značajno kod daljnjeg istraživanja ovog roda.

Agathobacter (*Eubacterium*) sljedeći je rod po zastupljenosti (koljeno *Firmicutes*). Članovi ovog roda sudjeluju u razgradnji polisaharida biljnog podrijetla. U skladu s time, njegova povećana zastupljenost uočena je kod populacije u Africi koju karakterizira prehrana bogata vlaknima (Rinninella i sur., 2019). Njihova smanjena zastupljenost uočena je kod nekih bolesti (Gacesa i sur., 2022).

Slijedi rod *Alistipes* (koljeno *Bacteroidetes*) koji se povezuje s prehranom bogatom namirnicama životinjskog podrijetla (Rinninella i sur., 2019).

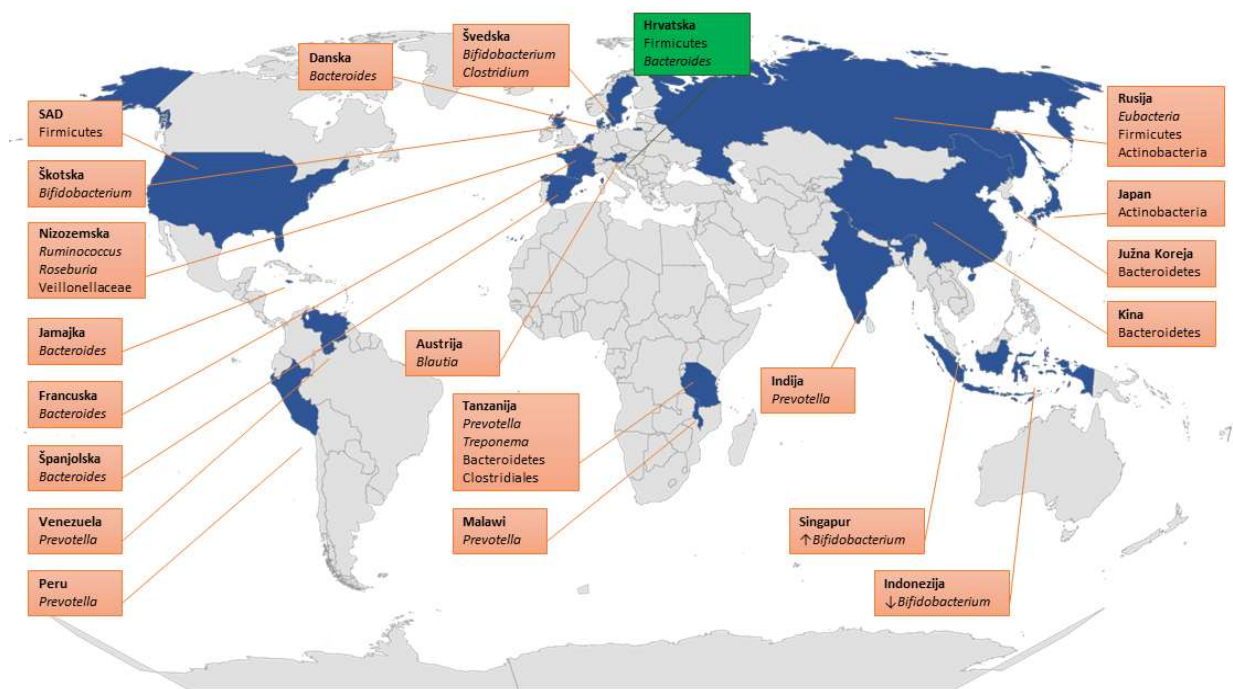
Bifidobacterium rod (koljeno *Actinobacteria*) sljedeći je po zastupljenosti. Karakteriziraju ga mnogobrojni povoljni učinci te se kao i ranije spomenuti *Faecalibacterium* upotrebljava kao probiotik. Osim toga, određeni sojevi *Bifidobacterium* mogu spriječiti rast i prijanjanje

enteropatogena na epitelne stanice (Vazquez-Gutierrez i sur., 2016). Kod populacije u Japanu ovaj je rod visoko zastupljen (Nishijima i sur., 2016). Povećana zastupljenost i raznolikost ovog roda uočena je kod djece koja su dojena, u usporedbi s onima koja nisu (Bezirtzoglou i sur., 2011). Naime, članovi ovog roda razgrađuju važnu komponentu majčinog mlijeka – galaktooligosaharide te tako proizvode butirat (Yaron i sur., 2013).

Sljedeći rod po zastupljenosti je *Prevotella*. Kod pojedinih ispitanika zastupljen je i do 28 %, no prisutan je u samo 24 uzorka (40,68 %). Ovaj se rod povezuje s prehranom bogatom namirnicama s visokim udjelom vlakana, biljnog podrijetla te je stoga visoko zastupljen u zemljama koje karakterizira takav način prehrane, poput Indije, Malawija, Venezuele i Perua. Konkretnije, populacije koje su promatrane u Peruu i Tanzaniji žive lovno-sakupljačkim načinom života čiju prehranu pretežito čini biljna hrana, sjemenke i med. Promatrane populacije u Malawiju i Venezueli žive tradicionalnim načinom života, sličan onom ljudi koji su prešli s nomadskog načina života na naseljavanje u sela te počeli uzgajati poljoprivredne kulture i pripitomljivati životinje (Slika 12) (Gomez i sur., 2016, Kao i sur., 2015, Nishijima i sur., 2016, Obregon-Tito i sur., 2015).

Nadalje, omjer *Prevotella/Bacteroides* potencijalno je važan pokazatelj sastava crijevne mikrobiote. Naime, uočene su značajne razlike u ovom omjeru između ljudi koji žive u urbanim i ruralnim područjima. Osim toga, ovaj se omjer pokazao smanjenim u pacijenata koji boluju od dijabetesa tipa 2 (Rinninella i sur., 2019). Kontradiktorno, neka su istraživanja povezala povećanu zastupljenost *Prevotella* roda upravo s dijabetesom te uz autoimune bolesti i upalne bolesti crijeva (Leite i sur., 2017, Pedersen i sur., 2016).

U ovom istraživanju također je, uz relativnu zastupljenost od 0,8-24 %, prisutan neidentificiran rod iz porodice *Lachnospiraceae*. Zanimljivo, u jednom je istraživanju pokazano da su neidentificirani članovi ove porodice povezani s konzumacijom tamne čokolade (Falony i sur., 2016).

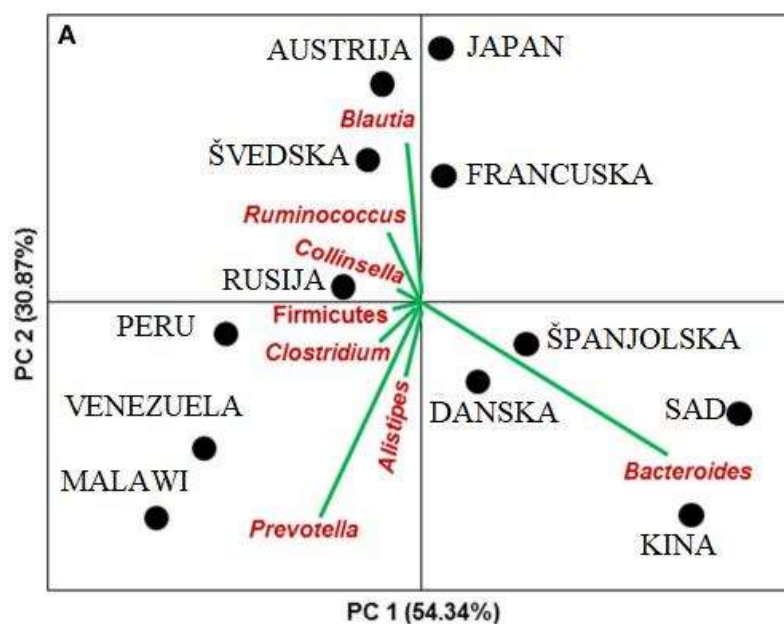


Slika 12. Povećana zastupljenost određenih taksonomskih grupa u crijevnoj mikrobioti različitih populacija diljem svijeta

4.4. TEMELJNI ČLANOVI CRIJEVNE MIKROBIOTE

Da bi se bolje razumjele ključne uloge mikrobiote i njena lakša identifikacija, usklađivanje i usporedba, važno je odrediti koji su to članovi mikrobiote prisutni kod svih populacija, a neovisno o geografiji, prehrambenim navikama, bolestima i drugim distinktivnim čimbenicima. Tako su okarakterizirana tri dominantna enterotipa: *Bacteroides*, *Prevotella* i *Ruminococcus*, koji predstavljaju ne samo taksonomsku već i funkcionalnu grupaciju. Tako članovi roda *Bacteroides*, koji je u ovom radu bio najzastupljeniji kod istraživane populacije, uglavnom pridobivaju energiju iz ugljikohidrata uz glikolizu i pentoza fosfatni put (Rinninella i sur., 2019). Upravo je ovaj enterotip okarakteriziran kao temeljni kod populacija u Europi i Americi (Human Microbiome Project Consortium, 2012) koje karakterizira prehrana bogata proteinima i mastima (Piquer-Esteban i sur., 2021). No, iako populaciju u Europi i SAD-u karakterizira istovjetna terminologija kada se radi o načinu prehrane, još uvijek postoje značajne razlike u prehrani između ove dvije populacije. Detaljnija bi istraživanja u ovom području mogla razjasniti u kojoj se mjeri to odražava na sastav mikrobiote.

Nadalje, rod *Prevotella* visoko je zastupljen u Malawiju (32 %), Peruu (14 %) i Venezueli (24 %), dok je u Kanadi (4 %), SAD-u (4 %) i u ovom radu istraživanoj populaciji (2,03 %) nisko zastupljen. *Blautia/Ruminococcus* pokazali su se prevladavajućima u Austriji, Švedskoj, Japanu i Francuskoj. Na slici 13 prikazani su temeljni članovi crijevne mikrobiote uzevši u obzir njihove relativne zastupljenosti unutar 12 populacija čiji članovi nemaju bolesti ili druga specifična zdravstvena stanja. Ovo potencijalno ukazuje na to u kojoj mjeri geografski čimbenici utječu na sastav mikrobiote te daje osnove za razumijevanje geografske isključivosti određenih taksonomskih grupa. Čimbenici koji utječu na ove razlike složeni su, kao i njihovo međudjelovanje.



Slika 13. Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*) prema relativnim zastupljenostima temeljnih (engl. *core*) taksonomskih grupa crijevne mikrobiote unutar 12 populacija – unatoč njihovoj prisutnosti u crijevnoj mikrobioti svih zdravih pojedinaca, njihova relativna zastupljenost razlikuje se među populacijama koje ne žive na istom geografskom području (prema Gupta i sur., 2017)

Ova saznanja dovode u pitanje univerzalnost terapijskih pristupa temeljenih na mikrobioti te postavljaju osnove za terapijske pristupe temeljene na razini populacije (Gupta i sur., 2017). Međutim, kao što su pokazali i rezultati u ovom radu, crijevna mikrobiota svakog pojedinca jedinstvena je i neizmjereno složena, stoga bi terapijski pristup trebao biti temeljen upravo na razini pojedinca.

Osim razlika u zastupljenosti pojedinih taksonomskih grupa među različitim populacijama, uočena je i razlika u raznovrsnosti sastava crijevne mikrobiote. Naime, manja raznovrsnost u sastavu primijećena je kod ljudi koji žive u urbaniziranim područjima, dok je veća kod onih koji žive tradicionalnijim načinom života. Ovo je i očekivano s obzirom na to da veća raznolikost pruža i veću stabilnost te funkcionalnu fleksibilnost, koje su i potrebne zbog veće prisutnosti patogena u neurbaniziranim područjima te češće prisutnim i nepredvidivim oscilacijama u prehrani (npr. prehrana isključivo sezonski dostupnim namirnicama). Industrijalizacijom i urbanizacijom ljudi su promijenili način života, žive u sigurnijim i higijenski povoljnijim uvjetima. Osim toga, dostupni su im antibiotici te visoko procesirana hrana. Sve navedeno odrazilo se i na sastav crijevne mikrobiote, čija se raznovrsnost posljedično smanjuje. Primjer je *Treponema* koja je pronađena kod svih populacija koje žive tradicionalnim načinom života te kod nekih primata, no ne i kod populacija koje žive u urbanim područjima. Može se reći da istima „fali“ dio mikrobiote koja je kod predaka imala važnu metaboličku ulogu, a time i utjecaj na zdravlje domaćina. Ovo potencijalno objašnjava neke od razloga sve više prisutnih alergija, astme, pretilosti, dijabetesa i drugih zdravstvenih stanja (Gupta i sur., 2017).

4.4.1. Izazovi u metodologiji tijekom istraživanja crijevne mikrobiote

Unatoč napredcima i porastu broja istraživanja crijevne mikrobiote, identifikacija temeljnih taksonomskih grupa kod svih zdravih pojedinaca nije jednostavna. Većina istraživanja, poput ovog, oslanja se na podatke vezane za 16S rRNA gen, što rijetko omogućava dovoljnu rezoluciju. Kako je navedeno ranije u ovom radu, pristup koji omogućava bolju rezoluciju i preciznije određuje zastupljenosti određenih taksonomskih grupa je *shotgun* metagenomsko sekvenciranje. Osim toga, nedavno provedeno istraživanje je pokazalo da PathoScope 2 i Kraken 2, bioinformatički alati dizajnirani upravo za metagenomska¹ istraživanja, nadmašuju Mothur i

¹ ovaj se izraz ponekad pogrešno koristi za amplikonska sekvenciranja (gdje se ne sekvencira *genom*) (Marchesi i Ravel., 2018)

QIIME 2 koji prvenstveno služe analizi amplikonskog 16S rRNA sekvenciranja (Odom i sur., 2023), provedenog i u ovom istraživanju.

Nadalje, u dostupnim bazama sekvenciranih mikrobioma prevladavaju oni prisutni kod ljudi zapadnog svijeta, što stvara dozu pristranosti (engl. *bias*) kod istraživanja. Piquer-Esteban i sur. (2021) ovom su problemu doskočili na način da su za istraživanje temeljnih članova crijevne mikrobiote upotrijebili *enrichment* metode kod populacija čiji mikrobiom nije ili je u manjoj mjeri sekvenciran. Potencijalni problem kod određenih baza je i neučestalo ažuriranje podataka (Odom i sur., 2023).

Ono što uz analizu podataka također povećava potencijalnu pristranost je i sam eksperimentalni dizajn i metodologija provedbe istraživanja. Zbog već spomenutog napretka u tehnikama sekvenciranja, istraživanje sastava vrlo složenih bioloških uzoraka danas je omogućeno široj akademskoj, kliničkoj i inim zajednicama. Međutim, rezultati određivanja njihovog sastava, pa tako i crijevne mikrobiote, mogu biti pod utjecajem uzorkovanja i skladištenja uzoraka kao i izolacije i sekvenciranja DNA. Svaki od navedenih koraka pritom potencijalno može doprinijeti pogrešci koja će se posljedično iskazati na samim rezultatima. To se odnosi na smrzavanje uzoraka, korištenje različitih otopina prisutnih u kitovima koje potencijalno utječu na prinos i kvalitetu izolirane DNA (Panek i sur., 2018) te činjenicu da je liza stanica određenih bakterija otežana (Boers i sur., 2019) što ih čini podzastupljenima u bazama podataka. Dubina sekvenciranja, izbor početnica, odabrane regije 16S rRNA gena od interesa, duljina očitavanja još su neki od potencijalnih faktora koji utječu na same rezultate ovakvih istraživanja. Od neizmjerne je važnosti stoga standardizirati metodološke pristupe čime bi se omogućili pouzdaniji rezultati analize i ponovljivost istih (Panek i sur., 2018).

5. ZAKLJUČCI

1. Analizom sastava crijevne mikrobiote promatrane populacije uz bioinformatički alat QIIME 2 relativno je uspješno određen taksonomski sastav iste. *Firmicutes* i *Bacteroidetes* utvrđeni su kao dva dominantna koljena, što je u skladu s literaturom. *Bacteroides* je najzastupljeniji rod među promatranom populacijom.
2. Najzastupljeniji članovi crijevne mikrobiote promatrane populacije podudaraju se sa sastavom crijevne mikrobiote populacija koje također žive u urbanim područjima. Suprotno, sastav crijevne mikrobiote promatrane populacije pokazao je razliku u sastavu mikrobiote s onim populacijama koje žive u ruralnim područjima.
3. S ciljem detaljnijeg razumijevanja uloge i sastava crijevne mikrobiote te omogućavanja individualnog terapijskog pristupa kod potencijalnih bolesti, provođenje sličnih istraživanja od neupitne je važnosti. Pritom uzorak ispitanika treba biti veći, kao i broj promatranih čimbenika koji potencijalno utječu na sastav mikrobiote. Uz to, poželjno je koristiti metode sekvenciranja koje karakterizira veća razlučivost.
4. Kako bi se smanjila pristranost prisutna u bazama podataka koje sadrže sekvencirane mikrobiome, na globalnoj je razini potrebno uskladiti metodološke pristupe kod sekvenciranja i analize podataka. Također, potrebno je prošiti bazu sekvenciranih mikrobioma onih populacija koje dosad nisu ili su u maloj mjeri istraživane.

6. LITERATURA

Andoh A, Nishida A, Takahashi K, Inatomi O, Imaeda H, Bamba S i sur. (2016) Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **59**, 65-70. 10.3164/jcbtn.15-152

Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling G (2011) Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* **17**, 478-482. 10.1016/j.anaerobe.2011.03.009

Boers SA, Jansen R i Hays JP (2019) Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **38**, 1059–1070. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03520-3>

Bultman S (2017) Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer. *Molecular Nutrition & Food Research* **61**, 1500902

Cantarel B, Lombard V, Henrissat B (2012) Complex Carbohydrate Utilization by the Healthy Human Microbiome. *PLoS ONE* **7**, e28742

Castellarin M, Warren R, Freeman J, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J i sur. (2012) *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research* **22**, 299-306. 10.1101/gr.126516.111

Cole J, Wang Q, Fish J, Chai B, McGarrell D, Sun Y i sur. (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* **42**, 633-642. 10.1093/nar/gkt1244

Cuevas-Ramos G, Petit C, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrede J (2010) *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 11537-11542. 10.1073/pnas.1001261107

David L, Maurice C, Carmody R, Gootenberg D, Button J, Wolfe B (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559-563. 10.1038/nature12820

De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14691-14696. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1005963107>

DeSantis T, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie E, Keller K et al. (2006) Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 5069-5072. 10.1128/AEM.03006-05

Durack J, Lynch S (2019) The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *Journal of Experimental Medicine* **216**, 20-40. 10.1084/jem.20180448

Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* **352**, 560–564. doi: 10.1126/science.aad3503

FDA (2023) FDA Approves First Orally Administered Fecal Microbiota Product for the Prevention of Recurrence of *Clostridioides difficile* Infection. FDA-Food and Drug Administration, <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-orally-administered-fecal-microbiota-product-prevention-recurrence-clostridioides>.

Pristupljeno 20. kolovoza 2023.

Gacesa R, Kurilshikov A, Vila AV, Sinha T, Klaassen MAY, Bolte LA, i sur., (2022) Environmental factors shaping the gut microbiome in a Dutch population. *Nature* **604**, 1-8. doi: 10.1038/s41586-022-04567-7

Gomez A, Petrzekova KJ, Burns MB, Yeoman CJ, Amato KR, Vlckova K, i sur. (2016). Gut microbiome of coexisting BaAka pygmies and bantu reflects gradients of traditional subsistence patterns. *Cell Rep.* **14**, 2142–2153. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.013

Goncalves P, Araujo J, Di Santo J (2018) A Cross-Talk Between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and the Host Mucosal Immune System Regulates Intestinal Homeostasis and Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* **24**, 558-572. 10.1093/ibd/izx029

Goulet O (2015) Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutrition Reviews* **73**, 32-40. doi: 10.1093/nutrit/nuv039

Groer M, Luciano A, Dishaw L, Ashmeade T, Miller E, Gilbert J (2014) Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. *Microbiome* **2**, 38. doi: 10.1186/2049-2618-2-38

Gu S, Chen Y, Zhang X, Lu H, Lv T, Shen P i sur. (2016) Identification of key taxa that favor intestinal colonization of *Clostridium difficile* in an adult Chinese population. *Microbes and Infection* **18**, 30-38. 10.1016/j.micinf.2015.09.008

Gupta VK, Sandip P, Chitra D (2017) Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1162. 10.3389/fmicb.2017.01162

Gut Microbiota for Health (2023) MetaHit, <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/metahit/>
Pristupljeno 21. kolovoza 2023.

Hallast P, Ebert P, Loftus M, Yilmaz F, Audano PA, Logsdon GA i sur. (2023) Assembly of 43 human Y chromosomes reveals extensive complexity and variation. *Nature* doi: 10.1038/s41586-023-06425-6

Hamajima H, Matsunaga H, Fujikawa A, Sato T, Mitsutake S, Yanagita T i sur. (2016) apanese traditional dietary fungus koji *Aspergillus oryzae* functions as a prebiotic for *Blautia coccoides* through glycosylceramide: Japanese dietary fungus koji is a new prebiotic. *SpringerPlus* **5**, 1321. 10.1186/s40064-016-2950-6

He B, Xu W, Santini P, Polydorides A, Chiu A, Estrella J i sur., (2007) Intestinal Bacteria Trigger T Cell-Independent Immunoglobulin A2 Class Switching by Inducing Epithelial-Cell Secretion of the Cytokine. *Immunity* **26**, 812-826. doi: 10.1016/j.immuni.2007.04.014

Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, Michel G. (2010) Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* **464**, 908-12. doi: 10.1038/nature08937

Heiman M, Greenway F (2016) A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. *Molecular Metabolism* **5**, 317-320. 10.1016/j.molmet.2016.02.005

Hiraoka S, Yang C, Iwasaki W (2016) Metagenomics and Bioinformatics in Microbial Ecology: Current Status and Beyond. *Microbes and environments* **31**, 204-212. 10.1264/jsme2.ME16024

Hollister E, Riehle K, Luna R, Weidler E, Rubio-Gonzales M, Mistretta T i sur., (2015) Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome* **3**, 36. doi: 10.1186/s40168-015-0101-x

Hooper L, Wong M, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI i sur. (2001) Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science* **291**, 881-884. doi: 10.1126/science.291.5505.881

Hornung B, Martins dos Santos V, Smidt H, Schaap P (2018) Studying microbial functionality within the gut ecosystem by systems biology. *Genes & Nutrition* **13**, 5. 10.1186/s12263-018-0594-6

Illumina (2023) 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf Pristupljeno 16. kolovoza 2023.

Illumina (2023) Order the MiSeq System <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq/order-miseq.html> Pristupljeno 16. kolovoza 2023.

Jakobsson H, Jernberg C, Andersson A, Sjölund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L (2010) Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLoS ONE* **5**, e9836. 10.1371/journal.pone.0009836

Janda J, Abbott S (2007) 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 2761-2764. 10.1128/JCM.01228-07

Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **21**, 8836–8847. <https://doi.org/10.3748/WJG.V21.I29.8787>

Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson J (2007) Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME Journal* **1**, 56-66. 10.1038/ismej.2007.3

Johnson J, Spakowicz D, Hong B, Petersen L, Demkowicz P, Chen L (2019) Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications* **10**, 5029. 10.1038/s41467-019-13036-1

Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O'Keefe S, Mitchel T i sur. (2016) Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Frontiers in Microbiology* 7. 10.3389/fmicb.2016.00459

Kao CC, Hsu J, Dwarkanath P, Karnes J, Baker TM, Bohren KM, i sur. (2016). Indian women of childbearing age do not metabolically conserve arginine as do American and Jamaican women. *J. Nutr.* **145**, 884–892. doi: 10.3945/jn.114.208231

Kim M, Oh H, Park S, Chun J (2014) Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 346-351. 10.1099/ijs.0.059774-0

Klingensmith N, Coopersmith C (2016) The Gut as the Motor of Multiple Organ Dysfunction in Critical Illness. *Critical Care Clinics* **32**, 203-212. 10.1016/j.ccc.2015.11.004

Kolodziejczyk A, Zheng D, Elinav E (2019) Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nature Review Microbiology* **17**, 742-753. doi: 10.1038/s41579-019-0256-8

Kudelka M, Stowell S, Cummings R, Neish A (2020) Intestinal epithelial glycosylation in homeostasis and gut microbiota interactions in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **17**, 597-617. 10.1038/s41575-020-0331-7

Leite A, Rodrigues N, Gonzaga M, Paiolo J, de Souza C, Stefanutto N (2017) Detection of Increased Plasma Interleukin-6 Levels and Prevalence of *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus* in the Feces of Type 2 Diabetes Patients. *Frontiers in Immunology* **8**. 10.3389/fimmu.2017.01107

Liu Y, Qin Y, Chen T, Lu M, Qian X, Guo X i sur. (2021) *Protein & Cell* **12**, 315-330. 10.1007/s13238-020-00724-8

Lv H, Zhang L, Han Y, Wu L, Wang B (2022) The Development of Early Life Microbiota in Human Health and Disease. *Engineering* **12**, 101-114. doi: 10.1016/J.ENG.2020.12.014

Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarette P i sur. (2020) The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* **12**, 1474. 10.3390/nu12051474

Marchesi JR, Ravel J (2015) The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* **3**, 3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>

Ng Q, Peters C, Ho C, Lim D, Yeo W (2018) A meta-analysis of the use of probiotics to alleviate depressive symptoms. *Journal of Affective Disorders* **228**, 13-19. 10.1016/j.jad.2017.11.063

Nishijima S, Suda W, Oshima K, Kim SW, Hirose Y, Morita H, i sur. (2016). The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res.* **23**, 125–133. doi: 10.1093/dnares/dsw002

Obregon-Tito AJ, Tito RY, Metcalf J, Sankaranarayanan K, Clemente JC, Ursell, LK i sur. (2015) Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nat. Commun.* **6**, 6505. doi: 10.1038/ncomms7505

Odom A, Faits T, Castro-Nallar E, Crandall KA, Johnson WE (2023) Metagenomic profiling pipelines improve taxonomic classification for 16S amplicon sequencing data. *Sci Rep.* **13**, 13957. doi: 10.1038/s41598-023-40799-x.

Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 279-289. PMID: 12369194

Qiu P, Ishimoto T, Fu L, Zhang J, Zhang Z, Liu Y (2022) The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **12**. 10.3389/fcimb.2022.733992

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P i sur. (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **42**, 590-596. 10.1093/nar/gks1219

Panda S, El khader I, Casellas F, Lopez Vivancos J, Garcia Cors M, Santiago A (2014) Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota. *PLoS ONE* **9**, e95476. 10.1371/journal.pone.0095476

Panek M, Čipčić Paljetak H, Barešić A, Perić M, Matijašić M, Lojkić I (2018) Methodology challenges in studying human gut microbiota – effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Scientific Reports* **8**, 5143. 10.1038/s41598-018-23296-4

Pedersen H, Gudmundsdottir V, Nielsen H, Hyotylainen T, Nielsen T, Jensen B (2016) Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* **535**, 376-381. 10.1038/nature18646

Piquer-Esteban S, Ruiz-Ruiz S, Arnau V, Diaz W, Moya A. (2021) Exploring the universal healthy human gut microbiota around the World. *Comput Struct Biotechnol J.* **20**, 421-433. doi: 10.1016/j.csbj.2021.12.035.

Poncheewin W, Hermes G, van Dam J, Koehorst J, Smidt H, Schaap P (2020) NG-Tax 2.0: A Semantic Framework for High-Throughput Amplicon Analysis. *Frontiers in Genetics* **10**. 10.3389/fgene.2019.01366

Rasko D, Rosovitz M, Myers G, Mongodin E, Fricke W, Gajer P (2008) The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic Isolate. *Journal of Bacteriology* **190**, 6881-6893. 10.1128/JB.00619-08

Rehman A, Rausch P, Wang J, Skieceviciene J, Kiudelis G, Bhagalia K, i sur. (2016) Geographical patterns of the standing and active human gut microbiome in health and IBD. *Gut* **65**, 238–248.

doi: 10.1136/gutjnl-2014-308341

Reva K, Laranjinha J, Rocha B (2023) Epigenetic Modifications Induced by the Gut Microbiota May Result from What We Eat: Should We Talk about Precision Diet in Health and Disease? *Metabolites* **13**, 375. doi: 10.3390/metabo13030375

Rhie A, Nurk S, Cechova M, Hoyt S, Taylor D, Altemose D i sur. (2023) The complete sequence of a human Y chromosome. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06457-y>

Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi G, Miggiano G, Gasbarrini A i sur. (2019) What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **7**, 14. 10.3390/microorganisms7010014

Roager H, Licht T (2018) Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nature Communications* **9**, 3294. 10.1038/s41467-018-05470-4

Rojo D, Mendez-Garcia C, Raczkowska B, Bargiela R, Moya A, Ferrer M i sur. (2017) Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. *FEMS Microbiol Rev* **41**, 453-478. doi: 10.1093/femsre/fuw046.

Rolhion N, Chassaing B, Nahori M, de Bodt J, Moura A, Lecuit M i sur. (2019) A *Listeria monocytogenes* Bacteriocin Can Target the Commensal *Prevotella copri* and Modulate Intestinal Infection. *Cell Host & Microbe* **26**, 691-701. 10.1016/j.chom.2019.10.016

Schnorr SL, Candela M, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C, Basaglia G, i sur. (2014). Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat. Commun.* **5**:3654. doi: 10.1038/ncomms4654

Sender R, Fuchs S, Milo R. (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **14(8)**, e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533

Shiryaev S, Remacle A, Chernov A, Golubkov V, Motamedchaboki K, Murana N i sur. (2013) Substrate Cleavage Profiling Suggests a Distinct Function of *Bacteroides fragilis* Metalloproteinases (Fragilysin and Metalloproteinase II) at the Microbiome-Inflammation-Cancer Interface. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 34956-34967. 10.1074/jbc.M113.516153

Snipen L, Liland K (2015) micropan: an R-package for microbial pan-genomics. *BMC Bioinformatics* **16**, 79. 10.1186/s12859-015-0517-0

Stackebrandt E, Goebel B (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **44**, 846-849. 10.1099/00207713-44-4-846

Su X, Jiang X, Meng L, Dong X, Shen Y, Xin Y (2018) Anticancer Activity of Sulforaphane: The Epigenetic Mechanisms and the Nrf2 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2018**, 1.10. 10.1155/2018/5438179

Teperić R (2018) Biokemija 2 (Interna skripta) str. 91

The Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207-214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>

Thermo Fisher Scientific (2023) Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/qubit-3-0-fluorometer/15387293>. Pristupljeno: 16. kolovoza 2023.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI (2007) The human microbiome project. *Nature* **449**, 804-810. doi: 10.1038/nature06244

Vazquez-Gutierrez P, de Wouters T, Werder J, Chassard C, Lacroix C (2016) High Iron-Sequestering Bifidobacteria Inhibit Enteropathogen Growth and Adhesion to Intestinal

Epithelial Cells In vitro. *Frontiers in Microbiology* 7. 10.3389/fmicb.2016.01480

Velagapudi V, Hezaveh R, Reigstad C, Gopalacharyulu P, Yetukuri L, Islam S i sur. (2010) The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *Journal of Lipid Research* **51**, 1101-1112. 10.1194/jlr.M002774

Ventola C (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* **40**, 277-283. PMID: 25859123

Vich Vila A, Imhann F, Collij V, Jankipersadsing S, Gurry T, Mujagić Z i sur. (2018) Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Science Translational Medicine* **10**, 472. 10.1126/scitranslmed.aap8914

Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojarvi J, Kootte R, Bartelsman J i sur. (2012) Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology* **143**, 913-916. 10.1053/j.gastro.2012.06.031

Vrieze A, Out C, Fuentes S, Jonker L, Reuling I, Kootte R (2014) Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *Journal of Hepatology* **60**, 824-831. 10.1016/j.jhep.2013.11.034

Wensel C, Pluznick J, Salzberg S, Sears C (2022) Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *Journal of Clinical Investigation* 132. 10.1172/JCI154944

Wirbel J, Pyl P, Kartal E, Zych K, Kashani A, Milanese A i sur. (2019) Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nature Medicine* **25**, 679-689. 10.1038/s41591-019-0406-6

Wong B, Lam S, Wong W, Chen J, Zheng T, Feng R i sur. (2004) Helicobacter pylori Eradication to Prevent Gastric Cancer in a High-Risk Region of China. *JAMA* **291**, 187. 10.1001/jama.291.2.187

Yaron S, Shachar D, Abramas L, Riskin A, Bader D, Litmanovitz I (2013) Effect of High β -Palmitate Content in Infant Formula on the Intestinal Microbiota of Term Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* **56**, 376-381. 10.1097/MPG.0b013e31827e1ee2

Yatsunenکو T., Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello M., Contreras M, i sur. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227. doi: 10.1038/nature11053

Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder M, Tigchelaar E, Schirmer M, Vatanen T (2016) Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* **352**, 565-569. 10.1126/science.aad3369

Zhou K (2017) Strategies to promote abundance of *Akkermansia muciniphila*, an emerging probiotics in the gut, evidence from dietary intervention studies. *Journal of Functional Foods* **33**, 194-201. 10.1016/j.jff.2017.03.045

Zmora N, Suez J, Elinav E (2019) You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **16**, 35-36. 10.1038/nature12820

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Salopek Marta, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis